

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos



TESIS DOCTORAL

Adquisición y modulación de la microbiota grastointestinal de niños prematuros

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laura Moles Alegre

Directores

Juan Miguel Rodríguez Gómez
Leónides Fernández Álvarez
Rosa del Campo Moreno

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



**ADQUISICIÓN Y MODULACIÓN DE LA MICROBIOTA
GASTROINTESTINAL DE NIÑOS PREMATUROS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Laura Moles Alegre

Bajo la dirección de los doctores

Juan Miguel Rodríguez Gómez

Leónides Fernández Álvarez

Rosa del Campo Moreno

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



**ADQUISICIÓN Y MODULACIÓN DE LA MICROBIOTA
GASTROINTESTINAL DE NIÑOS PREMATUROS**

Memoria que para optar al grado de
Doctor, con mención honorífica
“*Doctorado Europeus*”, presenta la
Licenciada Laura Moles Alegre

Madrid, 2015



Departamento de Nutrición, Bromatología
y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria

Ciudad Universitaria , s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91 394 3749. Fax: 91 394 37 43

JUAN MIGUEL RODRÍGUEZ GÓMEZ Y LEÓNIDES FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, PROFESORES TITULARES DE UNIVERSIDAD, DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID; Y ROSA DEL CAMPO MORENO, INVESTIGADORA DEL INSTITUTO RAMÓN Y CAJAL DE INVESTIGACIÓN SANITARIA ADSCRITA AL SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO RAMÓN Y CAJAL DE MADRID,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Adquisición y modulación de la microbiota gastrointestinal de niños prematuros”, de la que es autora la Licenciada Laura Moles Alegre, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección conjunta de los que suscriben, y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor con mención honorífica de “*Doctorado Europeo*”.

Madrid, 26 de Junio de 2015

Los Directores de la Tesis Doctoral,

Juan Miguel Rodríguez Gómez

Leónides Fernández Álvarez

Rosa del Campo Moreno

A mi familia

*“La verdadera ciencia enseña, por encima
de todo, a dudar y a ser ignorante”*

Miguel de Unamuno

*“No existen más que dos reglas para
escribir: Tener algo que decir y decirlo”*

Oscar Wilde

*“Begin at the beginning and go on till you
come to the end: then stop”*

Lewis Carroll
“Alice's Adventures in Wonderland”

Llega el momento de poner fin a mi doctorado, una etapa de mucho trabajo, infinito aprendizaje, superación y realización personal a la que no creía ser capaz de llegar. Una meta que no habría alcanzado sin el apoyo de todos vosotros:

Gracias a mis directores de Tesis, a los que admiro tanto por su conocimiento y capacidad de trabajo, como por su calidad humana y sencillez. A Juan, que con tus palabras despertaste mi curiosidad por "la microbiota" desde el primer día, por dirigir los pasos de este trabajo, por dedicarnos siempre un poquito de tu tiempo y preocuparte por nosotros (tus becarios), por hacer posible lo imposible y conseguir llegar siempre a tiempo; y sobre todo por considerarme para formar parte del grupo y del proyecto que ha dado lugar a esta Tesis. A Leo, por tu disponibilidad y cariño, por las horas dedicadas a revisar cada pequeña parte de este trabajo, por ser capaz de ver lo que a otros se nos escapa, por tu meticulosidad y bien hacer. A Rosa, por hacerme un hueco en tu laboratorio, por enseñarme en la ciencia y en la vida, por repetirme una y mil veces lo bonito que era este proyecto cuando más necesitaba escucharlo, por tus ideas y consejos y sobre todo por tu energía positiva y apoyo incondicional.

Gracias a mis compañeros de laboratorio con los que he compartido muchas horas de trabajo, pero también de charlas y risas. A Martita, con la que compartí gran parte de este trabajo y mucho más. Como tu dijiste, hemos compartido los mejores y peores momentos, sigo pensando que bastante bien lo hemos llevado! gracias por tu paciencia las primeras semanas, por tu cariño y apoyo, especialmente en nuestra estancia Holandesa, por los viajes y experiencias compartidas y por recordarnos a todos lo bonito de perseguir los sueños (lo lograste!). A Nivia por MIL cosas, sobre todo por enseñarme a tener una visión diferente de la vida, relativizar los problemas y saber sacar el lado positivo de las cosas. Por enseñarme a no abandonar y que con persistencia y "al mal tiempo buena cara" todo se logra. No puedo imaginar otras dos personas tan distintas y tan cercanas! Gracias por estar siempre ahí. A Esther por enseñarme nuevas técnicas en el laboratorio, por las horas y horas dedicadas a algunos de los artículos de esta tesis, por enseñarme a "escribir". A Susana, Javi e Irene, por vuestra vitalidad y alegría. A Virginia y Rebeca por compartir ese amor por la microbiología y el trabajo bien hecho. A Irene "PCR" por tu cariño, tu disponibilidad y tu orden impecable. A Pilar por tu valentía al enfrentarte a una Tesis en tu situación. A Diana por tu gran ayuda mediando con los médicos/ enfermeros del 12 de Octubre, por tu respuesta inmediata cuando he necesitado algún dato o artículo y sobre todo por la vitalidad que desprendes. A María por tus consejos y tu aportación bibliográfica. A los que durante estos años han pasado por el grupo aunque ya no estén aquí, Arantxa y Toñi por sus ideas en la presentación de resultados y su apoyo. A Elena, Irene, Ana y sobre todo a Raquelita, una persona admirable y una gran científica. A las nuevas caras que espero se queden durante mucho tiempo. A Cristina por tu dulzura, tu buen trabajo y disponibilidad para ayudar a cualquiera. A Lorena, por tu experiencia y por tu ofrecimiento a ayudar en papeleo/ artículos/ laboratorio. A Marina, Irma, Teresa y Sonia por vuestro espíritu joven y ganas de aprender. A mi Elena que tanto me ha ayudado estos últimos meses en el laboratorio, por tu dulzura,

curiosidad y paciencia!! Es una pena que no hayamos coincidido antes y haya podido dedicarte más tiempo, pero has sido una gran "alumna", has hecho un gran trabajo. Espero que te lleves un buen recuerdo de tu estancia en España y nuestro laboratorio. Mi mancherai!

A los compañeros de los laboratorios de arriba, los .Lab y los del fondo. Por estar siempre dispuestos a colaborar y hacer más llevaderas las tareas de docencia. Al personal del Dpto. por su amabilidad y trato cercano. A la gente que ameniza las horas de comida con temas de lo más freak a lo más mundano, Eva, Lola, Belén, Xavi, Carmencita y Carmen. Especialmente a Carmen sin la cual probablemente nunca hubiese llegado a contactar con mi grupo. Quien iba a decirme que mi experiencia Erasmus iba a terminar llevándome aquí.

Gracias a todos aquellos que han facilitado las cosas en cada una de mis estancias. A la gente del Ramón y Cajal, Bea, Merche y "las Martas" que con su cercanía y disponibilidad habéis hecho que me sienta una más. A Rocío por tu preocupación durante mi tiempo en Holanda y a Elena y Michel por amenizar mis largos 6 meses allí. A Donna S. por su infinita ayuda durante mi estancia en Perth. Por mostrarme el laboratorio, la ciudad y sus costumbres (aunque podrías haber olvidado la "Vegemite"). Por los viajes, las "clases" de bodyboard y las experiencias de mi estancia australiana que jamás olvidaré.

Gracias a mi familia, especialmente a mis padres por su esfuerzo al permitirme ir a la Universidad y por apoyar siempre mis decisiones, mis cambios de ciudad y estancias en otros países; y sobre todo por no juzgarme aunque muchas veces no entendieseis muy bien para qué todo eso era "necesario". A mi madre, a la que admiro por su dedicación y su fuerza. Por enseñarme que la vida es un continuo aprendizaje y que nunca es tarde para abordar un nuevo reto. A mi padre, quizás el mayor responsable de mi fascinación por la naturaleza. Por su alegría y por mostrarnos a lo largo de los años la importancia de saber disfrutar de nuestro trabajo. Gracias a los dos por no cortar mis alas. A mis hermanos, Mario y Nuria, por vuestro apoyo y cariño. Porque aunque pasemos tiempo sin saber los unos de los otros, se que siempre estáis ahí. No habría sido capaz de dar ninguno de los pasos que me han llevado aquí sin vosotros.

A los amigos que han seguido este trabajo. A mis biólogas (Pesetianas), especialmente a Teresa y Vanesa, por su interés y admiración por mi trabajo. A M^a Ángeles por los años de doctorado compartidos (aunque en disciplinas distintas), porque tu perseverancia y capacidad de trabajo son un ejemplo a seguir.

Gracias Sergio por tu paciencia, tu apoyo y tu cariño. Por vivir conmigo lo mejor y peor de mi doctorado. Por escuchar una y otra vez mis charlas en preparación, sin muchas veces poder seguirlas por completo. Por animarme a continuar en mis momentos más débiles, por ayudarme/ obligarme a desconectar en muchos otros y por hacerme beber cada día un poquito de "si puedes soñarlo, puedes hacerlo". Gracias por estar a mi lado.

Quería también agradecer al personal de los hospitales con los que hemos colaborado en los distintos trabajos que forman parte de esta Tesis, Hospital Universitario 12 de Octubre y Hospital Universitario La Paz; así como a las familias que han apoyado nuestros estudios y han aportado muestras para poder llevarlos a cabo.

Por último, gracias al Ministerio de Economía y Competitividad por conceder la beca ha permitido esta Tesis Doctoral.

Resumen



Summary

1. INTRODUCCIÓN

La colonización del tracto gastrointestinal es un proceso esencial que se inicia en el útero materno y que aumenta drásticamente durante el parto y los primeros días de vida. El recién nacido (RN) prematuro suele mostrar una microbiota retardada o aberrante, en su mayor parte, debido a su inmadurez pero también al contacto con el ambiente hospitalario. Los estudios de colonización gastrointestinal se han centrado en el intestino; sin embargo, el estómago inmaduro carece de motilidad rítmica o periódica, presenta un vaciado gástrico lento y un alto pH, lo que también puede alterar el proceso de colonización. La disbiosis del tracto gastrointestinal del prematuro puede alterar la función de nutrición, de protección y de barrera de la microbiota, aumentando la susceptibilidad a padecer ciertas enfermedades.

La alimentación es determinante para el correcto crecimiento y desarrollo del RN, existiendo un amplio consenso en que la leche de la propia madre es la opción óptima, seguida de la leche donada y, en caso de que no sea posible ninguna de las dos primeras, las fórmulas infantiles. En la práctica, los prematuros suelen recibir una alimentación mixta, dependiendo de su estado de salud, los protocolos de cada centro y la disponibilidad de leche de la propia madre y/o donada durante su hospitalización. Inicialmente, muchos prematuros reciben alimentación enteral mediante sonda nasogástrica, cuya superficie interna es susceptible de ser colonizada por bacterias del ámbito hospitalario; este hecho puede contribuir a la alteración de la microbiota del neonato. El uso de probióticos es una estrategia atractiva para la restauración de su microbiota, aunque su seguridad en RN de peso muy bajo o extremadamente bajo al nacer es todavía objeto de debate.

2. OBJETIVOS

1. Evaluar la diversidad bacteriana del contenido gástrico, del meconio y de las heces de niños prematuros durante su permanencia en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN) mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo.
2. Caracterizar el potencial patogénico de los grupos bacterianos mayoritarios en el tracto gastrointestinal de prematuros, tanto durante su permanencia en la UCIN como al cumplir los 2 años.
3. Determinar la composición microbiológica, inmunológica y bioquímica del calostro y de la leche de madres de recién nacidos prematuros.
4. Evaluar si la administración de *Bifidobacterium breve* PS12929 y *Lactobacillus salivarius* PS12934, dos cepas probióticas aisladas de leche humana, son capaces de ejercer una modulación microbiológica e inmunológica en prematuros de peso muy bajo o extremadamente bajo al nacer.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Los participantes (niños prematuros y, en ocasiones, sus madres) se reclutaron en el Hospital Universitario 12 de Octubre o en el Hospital Universitario La Paz (Madrid). Los protocolos de los estudios fueron aprobados por el comité de ética correspondiente. Cuando fue preciso, los prematuros recibieron como probiótico una mezcla de $\sim 1 \times 10^9$ unidades formadoras de colonia de *Bifidobacterium breve* PS12929 y de *Lactobacillus salivarius* PS12934 dos veces al día. Las muestras de meconio, heces, contenido gástrico y leche se almacenaron a -20°C hasta su análisis microbiológico mediante técnicas clásicas de cultivo.

La identificación de los aislados bacterianos se hizo mediante PCR específica de especie, secuenciación del 16S rRNA o espectrometría de masas combinada con la desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF, del inglés *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*).

La diversidad genética de los aislados se analizó por electroforesis en campo de pulso (PFGE, del inglés *Pulse Field Gel Electrophoresis*) y tipado por secuenciación de locus múltiples (MLST, del inglés *Multilocus Sequence Typing*). La susceptibilidad a antibióticos se determinó siguiendo las directrices y puntos de corte para cada género o especie recomendados por el *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

La concentración de lactosa, glucosa y mio-inositol en las muestras de calostro y leche se determinaron por cromatografía de gases. Las citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento e inmunoglobulinas se cuantificaron empleando un equipo BioPlex 200 y kits comerciales, mientras que para la calprotectina se usó un kit de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*).

Las muestras de DNA se secuenciaron con la tecnología Illumina que produce 2x250 lecturas en la unidad de Genómica de la Fundación del Parque Científico de Madrid o, alternativamente, con la plataforma FLX+System (Roche 454) en el FISABIO (<http://fisabio.san.gva.es>). Los dispositivos empleados para la alimentación se examinaron con un microscopio electrónico de barrido (JEOL 6400 JSM).

Los análisis estadísticos se realizaron con los programas Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.15 (Statpoint Technologies Inc., Virginia, USA) and R 2.13.2 (R project, Statistical Software; www.r-project.org).

4. RESULTADOS

El análisis de meconio y heces de niños prematuros mediante técnicas de cultivo reveló la dominancia de estafilococos y estreptococos en las muestras

de meconio y de estafilococos y enterococos en las muestras de heces. En general, la presencia de lactobacilos y bifidobacterias fue escasa y la colonización por enterobacterias se inició en la primera semana de vida. Los resultados obtenidos por HITChip confirmaron la dominancia del filo *Firmicutes* en meconio (63,4%) y *Proteobacteria* en heces (57,6%), mientras que los géneros más abundantes fueron *Propionibacterium*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* en las muestras de meconio y *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium* y diversas enterobacterias en las de heces.

Las muestras de los distintos tipos de leche se recogieron tras su paso por la tubuladura que conecta con la sonda nasogástrica. El perfil bacteriano de estas muestras fue similar en todas ellas, aunque el género *Staphylococcus* fue mayoritario en las de leche de la propia madre y *Enterococcus* en las de leche donada y fórmula. *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. y *Serratia* spp. se aislaron en los tres tipos de leche (materna, donada y fórmula). La presencia de los mismos grupos bacterianos en leche, contenido gástrico y heces se confirmó mediante genotipado por RAPD (del inglés *Random Amplification of Polymorphic DNA*) y PFGE (del inglés *Pulse Field Gel Electrophoresis*). Distintos niños compartieron las mismas cepas, lo que sugiere su origen ambiental. El análisis del interior de los sistemas de nutrición enteral, que permanecieron colocados durante 24 h, mediante microscopía electrónica de barrido permitió la observación de una compleja biopelícula bacteriana, que puede actuar como un posible foco de contaminación para los alimentos que pasan por ellos. Un análisis detallado de los grupos bacterianos dominantes mediante tipado por MLST (del inglés *Multi Locus Sequencing Type*), susceptibilidad a antibióticos y presencia de genes de virulencia, confirmó la presencia de clones de alto riesgo, propios del ambiente hospitalario. Sin embargo, la mayoría de estos clones habían sido sustituidos por bacterias con menor potencial patógeno cuando los niños cumplieron 2 años.

El estudio de la microbiota del contenido gástrico y de los alimentos suministrados a los RN pretérmino mostró la dominancia de los géneros *Serratia*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* y *Corynebacterium*. El análisis de los grupos minoritarios mostró que los géneros *Facklamia*, *Kocuria*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Balneimonas*, *Caulobacter*, *Micoplana*, *Halomonas*, *Raoultella*, *Shewanella* y *Mycoplasma* sólo estaban presentes en las muestras de contenido gástrico.

El estudio microbiológico del calostro de madres de niños prematuros reveló la presencia de especies de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Lactobacillus* en calostro. A estos géneros se les sumaron algunas especies de *Enterococcus* y de enterobacterias en las muestras de leche obtenidas en las semanas posteriores. Las concentraciones de lactosa y glucosa en el calostro y en la leche de madres de niños prematuros fueron similares a las existentes en los respectivos fluidos obtenidos de madres de niños a término; en contraste, el contenido de mio-inositol, un compuesto que parece tener un papel

importante en la salud inicial del neonato, fue especialmente elevado en el calostro de madres de niños prematuros. Globalmente, la frecuencia y concentración de un amplio espectro de inmunocompuestos fue mayor en las muestras de calostro, especialmente en el producido tras un parto prematuro.

La administración de las cepas probióticas *Bifidobacterium breve* PS12929 y *Lactobacillus salivarius* PS12934, aisladas de leche humana, a prematuros de peso muy bajo o extremadamente bajo al nacer condujo a una mayor presencia de *Bifidobacterium* y *Firmicutes* (principalmente *Enterococcus* y *Lactobacillus*) y a una disminución de *Proteobacteria* en heces. El estudio inmunológico reveló un aumento en la concentración de diversos inmunocompuestos relacionados con procesos antiinflamatorios y una progresiva disminución en la concentración de calprotectina, un biomarcador de inflamación.

5. CONCLUSIONES

1. La microbiota gastrointestinal de los niños prematuros es fluctuante y muestra una elevada variabilidad interindividual pero, en general, se caracteriza por una escasa presencia de bifidobacterias y lactobacilos y un claro predominio de los microorganismos asociados al ambiente hospitalario, incluyendo la presencia de clones de alto riesgo con resistencia a los antibióticos y factores de virulencia.
2. Los sistemas de alimentación enteral utilizados en prematuros constituyen un importante foco de proliferación para los microorganismos asociados al ambiente hospitalario, que pueden contaminar el alimento suministrado y colonizar el tracto gastrointestinal infantil.
3. La microbiota fecal de niños nacidos prematuramente se normaliza a los 2 años de edad, con un reemplazo de los clones de alto riesgo asociados al hospital por otros clones típicamente comunitarios.
4. La composición bioquímica e inmunológica del calostro y la leche de madres de niños prematuros es particularmente adecuada para los requerimientos nutricionales, de crecimiento y desarrollo de esta población.
5. La administración de *Bifidobacterium breve* PS12929 y *Lactobacillus salivarius* PS12934, dos cepas probióticas aisladas de leche humana, parece ser segura y ejercer efectos beneficiosos en la modulación microbiológica e inmunológica de niños prematuros.

1. INTRODUCTION

The gastrointestinal tract colonization is an essential process that starts in the uterus and drastically increases during delivery and the first days of life. Preterm infant immaturity and long hospital stay usually lead to a delayed or aberrant microbiota. The gut has been the subject of most studies concerning gastrointestinal colonization. Immature stomach is characterized by the absence of rhythmic motility, a slow gastric emptying and a relatively high gastric pH, facts that can be determinant in gastric colonization. Dysbiosis in the gastrointestinal tract of preterm infants may disrupt the barrier, nutritional and immunological functions of the host microbiota and increases the susceptibility to certain diseases.

Feeding is a key factor in the proper growth and development of the preterm baby. There is a wide consensus in considering that own mothers' milk is the optimal feeding option, followed by donor's milk and preterm formula, when none of the first two options is available. In practice, preterm neonates frequently receive a mixed diet regime, depending on their health status, the internal hospital protocols and the availability of either own mothers' milk or donor milk during their stay at the NICU. Initially, many preterms receive enteral feeding through nasogastric enteral feeding tubes; their inner surfaces act as important loci for colonization by hospital-associated bacteria and, therefore, may negatively impact infant health. The use of probiotics has been proposed as an attractive strategy to restore the normal gut microbiota in preterm infants although its safety is still a matter of debate in relation to very low- and extremely low-birth weight infants.

2. OBJECTIVES

1. To evaluate the bacterial diversity in a collection of samples of gastric content, meconium and feces obtained from preterm infants during their NICU stay using culture-dependent and -independent techniques.
2. To characterize the main potentially pathogenic bacterial groups present in the gastrointestinal tract of premature infants during their NICU stay and, also, when they were 2-year-old.
3. To determine the microbiological, immunological and biochemical composition of colostrum and milk from mothers of preterm neonates.
4. To analyze if the administration of *Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934, two probiotic strains isolated from human milk, is able to exert microbiological and immunological modulatory effects in very low- and extremely low-birth weight infants.

3. MATERIAL AND METHODS

Participants (preterm infants and, when indicated, their mothers) were recruited at the Hospital Universitario 12 de Octubre or the Hospital Universitario La Paz (Madrid, Spain). The protocols of the studies were approved by the corresponding ethical committee. When required, preterms received a probiotic ($\sim 1 \times 10^9$ colony-forming units of both *Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934) twice a day. Meconium, fecal, gastric, and milk samples were stored at -20°C until microbiological analysis using classic culture methods.

Bacterial identification was performed by species specific PCR, 16S rRNA PCR sequencing or matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Genetic diversity of the isolates was assessed by Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Multilocus Sequence Typing (MLST). Antibiotic susceptibility was determined following the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines and breakpoints for each genus/specie.

The concentrations of lactose, glucose, and myo-inositol in colostrum and milk samples were determined by gas chromatography. Cytokines, chemokines, growth factors, and immunoglobulins were quantified using a Bioplex 200 system instrument and commercial kits, while an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit was used for calprotectin.

DNA samples were sequenced with Illumina technology reads 2×250 at the Unidad de Genómica of the Fundación Parque Científico de Madrid (Spain) or, alternatively, with FLX+System (Roche 454) platform at the FISABIO institution (<http://fisabio.san.gva.es>). Feeding devices were examined using a scanning electron microscope (JEOL 6400 JSM).

Statgraphics Centurion XVI version 16.1.15 (Statpoint Technologies Inc., Virginia, USA) and R 2.13.2 (R project, Statistical Software; www.r-project.org) software were used to carry out the statistical analyses.

4. RESULTS

The culture-dependent analysis of meconium and fecal samples from preterms revealed that staphylococci and streptococci were the dominant bacterial groups in the meconium samples and staphylococci and enterococci in the fecal ones. Lactobacilli and bifidobacteria were scarce and enterobacteria colonized the infants' gut after the first week of life. The main results obtained by using the HITChip procedure were the dominance of the *Firmicutes* phylum in meconium (63.4%) and *Proteobacteria* in feces (57.6%). Some genus-like groups were more abundant in meconium (*Propionibacterium*, *Lactobacillus* and *Streptococcus*) and others in feces (enterobacteria, *Enterococcus*, *Bacteroides* or *Clostridium*).

Feeding samples (own mothers' milk, donor milk, preterm formula) were taken after their pass through the external feeding tube that connects with the nasogastric one, and were studied by culture-based techniques. A very similar bacterial profile could be observed in the three different food types although *Staphylococcus* dominated own mother's milk samples and *Enterococcus* the donor milk and formula ones. *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. and *Serratia* spp. were also isolated from the three feed types. The presence of the same dominant genera in the samples of food, gastric content and feces was confirmed by RAPD and PFGE genotyping. Different preterm infants shared some bacterial strains, a fact that suggested their environmental origin. The analysis of the inner surface of the enteral feeding systems by scanning electron microscopy revealed the existence of a complex bacterial biofilm that could act as a contamination focus. A detailed analysis of the dominant bacterial groups (MLST typing, antibiotic susceptibility and presence of virulence genes) confirmed the presence of high-risk clonal complexes. However, the proportion of high-risk clones was notably reduced in the feces of the same infants when they were 2-year-old.

The microbiome study of the feeding samples and the gastric content of the preterm infants revealed that *Serratia*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* and *Corynebacterium* were the dominant genera. Analysis of minority bacterial groups showed that the genera *Facklamia*, *Kocuria*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Balneimonas*, *Caulobacter*, *Micoplana*, *Halomonas*, *Raoultella*, *Shewanella* and *Mycoplasma* were exclusively found in the gastric content samples.

Culture-based analysis of colostrum from mothers of preterm infants revealed the presence of *Staphylococcus*, *Streptococcus*, and *Lactobacillus* whereas, in addition to these genera, *Enterococcus* and enterobacteria were also isolated from mature milk. Lactose and glucose concentrations in colostrums and milk of women delivering preterm babies were similar to those found in the respective biological fluids obtained from mothers of term infants; in contrast, that of myo-inositol, a compound that may play a critical role in the initial health of preterm neonates, was particularly high in colostrum samples collected after preterm delivery. Globally, the frequency and concentration of a wide spectrum of immunocompounds were higher in the colostrums samples, especially in those provided by women having preterm babies.

Administration of *Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934, two probiotic strains isolated from human milk, to very low- and extremely low-birth weight infants led to an increase of the *Bifidobacterium* and *Firmicutes* (mainly represented by *Enterococcus* and *Lactobacillus*) populations in feces, and to a reduction in those of *Proteobacteria*. Immunological assays revealed an increase in the concentrations of immunocompounds related to anti-inflammatory processes. In contrast, that of calprotectin, an inflammatory biomarker, decreased along time.

5. CONCLUSIONS

1. The gastrointestinal microbiota of preterm infants showed to be fluctuating and displayed a highly interindividual variability but, globally, it was dominated by hospital-associated microorganisms, including high-risk clones, while the presence of members of the genera *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* is scarce.
2. Preterm feeding systems can be important loci for the proliferation of hospital-associated microorganisms, which can contaminate the foods that are administered through such devices and, subsequently, colonize the infants' gastrointestinal tract.
3. The fecal microbiota of infants that were born preterm becomes normalized when they are 2-year-old, including a significantly reduction in the presence of high-risk clones.
4. The biochemical and immunological composition of the colostrum and milk of women delivering preterm infants is particularly suited for the nutritional, growth and development requirements of this population.
5. The administration of *Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934, two probiotic strains isolated from human milk, seems to be safe and to exert beneficial microbiological and immunological effects in preterm infants.



I. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR	1
II. INTRODUCCIÓN	5
II. 1. RECIÉN NACIDO PREMATURO	7
II. 1. 1. CONCEPTO	7
II. 1. 2. INCIDENCIA	9
II. 1. 3. CAUSAS DE PREMATURIDAD	12
II. 1. 3. 1. Partos prematuros espontáneos	14
II. 1. 3. 2. Partos prematuros inducidos	18
II. 1. 4. PROBLEMAS DE SALUD ASOCIADOS AL NACIMIENTO PREMATURO	20
II. 1. 5. PREVENCIÓN	26
II. 1. 5. 1. Prevención del parto pretérmino antes del embarazo	27
II. 1. 5. 2. Prevención del parto pretérmino durante el embarazo	30
II. 1. 5. 3. Tratamiento del parto pretérmino cuando se ha desencadenado	31
II. 1. 6. MANEJO DEL RECIÉN NACIDO PREMATURO	32
II. 1. 6. 1. Manejo del prematuro en la sala de partos	32
II. 1. 7. MANEJO DE NIÑOS PREMATUROS: ALIMENTACIÓN	34
II. 1. 7. 1. Lactancia materna	36
II. 1. 7. 2. Leche materna donada	42
II. 1. 7. 3. Fortificantes de la leche humana	46
II. 1. 7. 4. Fórmulas infantiles	49
II. 1. 7. 5. Nutrición parenteral y enteral	51
II. 1. 7. 6. Monitorización del crecimiento y ganancia ponderal	53
II. 2. LA MICROBIOTA GASTROINTESTINAL	54
II. 2. 1. DIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA GASTROINTESTINAL	56
II. 2. 2. ADQUISICIÓN Y EVOLUCIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL INFANTIL	61
II. 2. 2. 1. Periodo fetal	61
II. 2. 2. 2. Nacimiento y periodo postnatal	63
II. 2. 3. FUNCIONES DE LA MICROBIOTA INTESTINAL	66
II. 2. 4. MICROBIOTA INTESTINAL DEL NIÑO PREMATURO	71
II. 2. 5. SEPSIS Y NEC EN EL NIÑO PREMATURO	77
II. 2. 6. MODULACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE LOS PREMATUROS MEDIANTE EL EMPLEO DE PROBIOTICOS	80
III. DIVERSIDAD BACTERIANA EN EL MECONIO DE RECIÉN NACIDOS PREMATUROS Y EVOLUCIÓN DE LA MICROBIOTA FECAL DURANTE EL PRIMER MES DE VIDA	87
III. 1. ABSTRACT	89
III. 2. INTRODUCTION	89
III. 3. MATERIAL AND METHODS	90
III. 3. 1. PATIENTS AND SAMPLING	90
III. 3. 2. ETHICS STATEMENT	90
III. 3. 3. CULTURE ANALYSIS OF THE SAMPLES	90
III. 3. 4. BACTERIAL GENOTYPING AND IDENTIFICATION	90
III. 3. 5. DNA EXTRACTION FROM MECONIUM AND FECES	91

III. 3. 6. PCR AMPLIFICATION AND DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS (PCR-DGGE)	91
III. 3. 7. HUMAN INTESTINAL TRACT CHIP (HITCHIP) ANALYSIS	92
III. 3. 8. STATISTICAL ANALYSIS	93
III. 4. RESULTS	94
III. 4. 1. CHARACTERISTICS OF THE INFANTS	94
III. 4. 2. CULTURE ANALYSIS OF THE MECONIUM AND FECAL SAMPLES	94
III. 4. 3. PCR-DGGE ANALYSIS	96
III. 4. 4. HITCHIP ANALYSIS	98
III. 4. 5. COMPARISON BETWEEN THE RESULTS OBTAINED BY CULTURES AND HITCHIP	98
III. 5. DISCUSSION	99
III. 6. REFERENCES	100

IV. COLONIZACIÓN INTESTINAL EN LOS RECIÉN NACIDOS

PREMATUROS: EFECTO DE LAS SONDAS DE ALIMENTACIÓN ENTERAL

121

IV. 1. ABSTRACT	123
IV. 2. INTRODUCTION	124
IV. 3. METHODS	125
IV. 3. 1. SUBJECTS AND SAMPLING	125
IV. 4. RESULTS	127
IV. 4. 1. CHARACTERISTICS OF THE INFANTS	127
IV. 4. 2. MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF OWN MOTHER'S MILK, DONOR HUMAN MILK AND PRETERM FORMULA AFTER THEIR PASS THROUGH ENTERAL FEEDING TUBES	127
IV. 4. 3. CULTURE ANALYSIS OF THE MECONIUM AND FECAL SAMPLES	128
IV. 4. 4. GENOTYPING OF MILK AND FECAL ISOLATES	129
IV. 4. 5. SEM ANALYSIS OF THE NETS	129
IV. 5. DISCUSSION	131
IV. 6. REFERENCES	134

V. COLONIZACIÓN INTESTINAL EN LA UCI NEONATAL DE RECIÉN

NACIDOS PREMATUROS Y RECUPERACIÓN 2 AÑOS DESPUÉS

157

V. 1. ABSTRACT	159
V. 2. INTRODUCTION	160
V. 3. METHODS	161
V. 3. 1. SUBJECTS AND SAMPLING	161
V. 3. 2. CULTURE ANALYSIS OF THE SAMPLES	161
V. 3. 3. BACTERIAL IDENTIFICATION AND GENOTYPING	162
V. 3. 4. GENETIC DIVERSITY	162
V. 3. 5. ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING	163
V. 3. 6. VIRULENCE FACTORS CARRIAGE	163
V. 4. RESULTS	164
V. 5. DISCUSSION	166
V. 6. REFERENCES	168

<u>VI. DIVERSIDAD BACTERIANA DEL CONTENIDO GÁSTRICO DE NIÑOS PREMATUROS DURANTE SU ESTANCIA EN LA UCIN</u>	185
VI. 1. ABSTRACT	187
VI. 2. INTRODUCTION	188
VI. 3. METHODS	189
VI. 3. 1. STUDY DESIGN	189
VI. 3. 2. CULTURE ANALYSIS	189
VI. 3. 3. BACTERIAL IDENTIFICATION	190
VI. 3. 4. GENETIC DIVERSITY OF <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> AND <i>Escherichia coli</i> ISOLATES	190
VI. 3. 5. DNA EXTRACTION FROM THE GASTRIC SAMPLES	191
VI. 3. 6. NEXT GENERATION SEQUENCING ANALYSIS	191
VI. 3. 7. STATISTICAL ANALYSIS	191
VI. 4. RESULTS	193
VI. 4. 1. CHARACTERISTICS OF THE PRETERM POPULATION	193
VI. 4. 2. CULTURE-BASED ANALYSIS OF THE GASTRIC CONTENT SAMPLES	193
VI. 4. 3. METAGENOMIC ANALYSIS OF THE GASTRIC CONTENT AND MILK SAMPLES	194
VI. 5. DISCUSSION	195
VI. 6. REFERENCES	197
<u>VII. PROPIEDADES BACTERIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E INMUNOLÓGICAS DEL CALOSTRO Y LECHE MADURA DE MADRES DE RECIÉN NACIDOS EXTREMADAMENTE PREMATUROS</u>	209
VII. 1. ABSTRACT	211
VII. 2. INTRODUCTION	211
VII. 3. METHODS	212
VII. 3. 1. COLOSTRUM AND MATURE MILK SAMPLES	212
VII. 3. 2. BACTERIAL CULTURES AND IDENTIFICATION OF ISOLATES	212
VII. 3. 3. ANALYSIS OF LACTOSE, GLUCOSE, AND <i>myo</i> -INOSITOL	212
VII. 3. 4. IMMUNOLOGICAL ANALYSIS	212
VII. 3. 5. STATISTICAL ANALYSIS	213
VII. 4. RESULTS	213
VII. 4. 1. STUDY PARTICIPANTS	213
VII. 4. 2. BACTERIAL COUNTS AND IDENTIFICATION OF THE ISOLATES	213
VII. 4. 3. ANALYSIS OF LACTOSE, GLUCOSE, AND <i>myo</i> -INOSITOL	213
VII. 4. 4. IMMUNOLOGICAL ANALYSIS	214
VII. 5. DISCUSSION	215
VII. 6. REFERENCES	216
<u>VIII. ADMINISTRACIÓN DE BIFIDOBACTERIUM BREVE PS12929 Y LACTOBACILLUS SALIVARIUS PS12934, DOS CEPAS AISLADAS DE LECHE HUMANA, A PREMATUROS DE MUY BAJO Y EXTREMADAMENTE BAJO PESO AL NACER: ESTUDIO PILOTO</u>	219

VIII. 1. ABSTRACT	221
VIII. 2. INTRODUCTION	221
VIII. 3. MATERIAL AND METHODS	222
VIII. 3. 1. STUDY DESIGN AND SAMPLING	222
VIII. 3. 2. MICROBIOLOGICAL ANALYSIS	222
VIII. 3. 3. IMMUNOLOGICAL ANALYSIS	222
VIII. 3. 4. STATISTICAL ANALYSIS	223
VIII. 4. RESULTS	223
VIII. 4. 1. DEMOGRAPHIC AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF THE PARTICIPANTS	223
VIII. 4. 2. MICROBIOLOGICAL ANALYSIS	223
VIII. 4. 3. IMMUNOLOGICAL ANALYSIS	224
VIII. 4. 4. MULTIVARIATE ANALYSIS OF THE STUDIED POPULATION	225
VIII. 5. DISCUSSION	228
VIII. 5. REFERENCES	231
<u>IX. DISCUSIÓN GENERAL</u>	<u>233</u>
IX. 1. DIVERSIDAD BACTERIANA EN EL MECONIO, HECES Y CONTENIDO GÁSTRICO DE LOS NIÑOS PREMATUROS	235
IX. 1. 1. DIVERSIDAD BACTERIANA INTESTINAL DURANTE LAS TRES PRIMERAS SEMANAS DE VIDA	235
IX. 1. 2. EVOLUCIÓN DE LA MICROBIOTA DE LOS RECIÉN NACIDOS PREMATUROS: SEGUIMIENTO A LOS DOS AÑOS DE EDAD	240
IX. 1. 3. DIVERSIDAD BACTERIANA GÁSTRICA DURANTE EL PRIMER MES DE VIDA	242
IX. 1. 4. COLONIZACIÓN DEL INTESTINO DE LOS NIÑOS PREMATUROS POR CLONES DE ALTO RIESGO Y EVOLUCIÓN A LOS DOS AÑOS	245
IX. 1. 5. INFLUENCIA DE LOS SISTEMAS DE ALIMENTACIÓN ENTERAL EN LA MICROBIOTA DE LOS ALIMENTOS RECIBIDOS POR LOS RECIÉN NACIDOS PREMATUROS	249
IX. 2. PROPIEDADES BACTERIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E INMUNOLÓGICAS DEL CALOSTRO Y DE LA LECHE DE MADRES DE NIÑOS EXTREMADAMENTE PREMATUROS	253
IX. 3. MODULACIÓN DE LA MICROBIOTA DE LOS NIÑOS PREMATUROS	257
<u>X. CONCLUSIONES</u>	<u>265</u>
<u>XI. BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>269</u>
<u>XII. RESUMEN AMPLIADO</u>	<u>305</u>
XII. 1. INTRODUCCIÓN	307
XII. 2. OBJETIVOS	309
XII. 3. RESULTADOS	310
XII. 3. 1. EVOLUCIÓN DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA DE MECONIO Y HECES DE RECIÉN NACIDOS PREMATUROS	310

XII. 3. 2. PAPEL DE LAS SONDAS DE ALIMENTACIÓN ENTERAL EN LA COLONIZACIÓN BACTERIANA DE NIÑOS PREMATUROS	310
XII. 3. 3. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS POTENCIALMENTE PATÓGENAS AISLADAS DE NIÑOS PREMATUROS Y LA LECHE EMPLEADA PARA SU ALIMENTACIÓN	311
XII. 3. 4. EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA DEL CONTENIDO GÁSTRICO DE NIÑOS PREMATUROS	312
XII. 3. 5. COMPOSICIÓN MICROBIOLÓGICA, INMUNOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE CALOSTRO Y LECHE DE MADRES DE NIÑOS PREMATUROS	313
XII. 3. 6. ADMINISTRACIÓN DE <i>Bifidobacterium breve</i> PS12929 y <i>Lactobacillus salivarius</i> PS12934, DOS CEPAS PROBIÓTICAS AISLADAS DE LECHE HUMANA, A RECIÉN NACIDOS DE MUY BAJO Y EXTREMADAMENTE BAJO PESO AL NACER: EFECTO EN LA MODULACIÓN MICROBIOLÓGICA E INMUNOLÓGICA	313
XII. 4. CONCLUSIONES	315
XII. 5. BIBLIOGRAFÍA	316
XIII. EXTENDED ABSTRACT	321
XIII. 1. INTRODUCTION	323
XIII. 2. OBJECTIVES	326
XIII. 3. RESULTS	327
XIII. 3. 1. ASSESSMENT OF THE BACTERIAL DIVERSITY IN MECONIUM AND FECES OF PRETERM INFANTS	327
XIII. 3. 2. ROLE OF THE FEEDING TUBES IN THE BACTERIAL COLONIZATION OF PRETERM INFANTS	327
XIII. 3. 3. CHARACTERIZATION OF THE POTENTIALLY PATHOGENIC BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM THE PRETERM AND FEEDING SAMPLES	328
XIII. 3. 4. ASSESSMENT OF THE BACTERIAL DIVERSITY IN THE GASTRIC CONTENT OF PRETERM INFANTS	329
XIII. 3. 5. MICROBIOLOGICAL, IMMUNOLOGICAL AND BIOCHEMICAL COMPOSITION OF COLOSTRUM AND MILK FROM MOTHERS OF PRETERM NEONATES	330
XIII. 3. 6. ADMINISTRATION OF <i>Bifidobacterium breve</i> PS12929 AND <i>Lactobacillus salivarius</i> PS12934, TWO PROBIOTIC STRAINS ISOLATED FROM HUMAN MILK, TO VERY LOW AND EXTREMELY LOW-BIRTH WEIGHT INFANTS: MICROBIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL MODULATORY EFFECTS	331
XIII. 4. CONCLUSIONS	333
XIII. 5. REFERENCES	334
XIV. APÉNDICES	341
XIV. 1. ANEXO AL CAPÍTULO VIII: RESULTADOS DE LA PIROSECUENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS	343
XIV. 1. 1. MATERIAL AND METHODS	343

XIV. 1. 2. RESULTS	344
XIV. 1. 3. REFERENCES	344
XIV. 2. BACTERIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL PROFILE OF PRETERM INFANT GUT: A TWO-YEARS FOLLOW-UP STUDY	347
XIV. 2. 1. ABSTRACT	347
XIV. 2. 2. INTRODUCTION	348
XIV. 2. 3. METHODS	349
XIV. 2. 3. 1. Patients and sampling	349
XIV. 2. 3. 2. Human Intestinal Tract Chip (HITChip) analysis	349
XIV. 2. 3. 3. Immunological analysis	350
XIV. 2. 3. 4. Statistical analysis	350
XIV. 2. 4. RESULTS	351
XIV. 2. 4. 1. Characteristics of the infants	352
XIV. 2. 4. 2. HITChip analysis	352
XIV. 2. 4. 3. Immunological analysis	353
XIV. 2. 5. DISCUSSION	356
XIV. 2. 6. REFERENCES	358
XIV. 3. LISTADO DE TABLAS	374
XIV. 4. LISTADO DE FIGURAS	375

I. Exposición general del problema a investigar



Cada vez parece más evidente que el riesgo de sufrir diversas enfermedades a lo largo de la vida está en relación al proceso de adquisición de la microbiota en los primeros años de la vida (El Aidy et al., 2013; Fouhy et al., 2012; Renz et al., 2012; Sim et al., 2013; Stockinger et al., 2011; Weng y Walker, 2013; White et al., 2013). En general, se considera que el prototipo ideal de microbiota gastrointestinal durante el periodo infantil es la existente en los niños sanos, nacidos por parto vaginal tras un embarazo a término sin ninguna complicación, que no han recibido medicación y que se han alimentado con leche de la propia madre (Penders et al., 2006). Sin embargo, este estándar de colonización puede verse alterado por numerosos factores, incluyendo la base genética y epigenética del individuo, su edad gestacional, el tipo de parto, la forma de alimentación, el ambiente en el que reside o el uso de antibióticos y otros medicamentos (Adlerberth y Wold, 2009; Fanaro et al., 2003).

En este sentido, los niños prematuros tienen una experiencia postnatal muy distinta, en general, de la de los nacidos a término. Tienen una edad gestacional y peso inferior, en muchas ocasiones nacen tras rotura prematura o prolongada de membranas, suelen recibir antibióticos y otros medicamentos, están inmersos en un ambiente hospitalario durante periodos relativamente prolongados, tienen retraso en el inicio de la alimentación enteral (y, cuando se inicia, puede no ser con la leche de la propia madre), poseen una barrera gástrica alterada y, con cierta frecuencia, sus madres han sufrido infecciones o disbiosis microbianas en la cavidad oral, tracto gastrointestinal o en el ámbito genitourinario durante el embarazo (Dial, 2009). Todos estos factores conducen a una alteración en el establecimiento de la microbiota intestinal, que se ha llegado a describir como aberrante. Este hecho aumenta el riesgo de sufrir infecciones que, en ocasiones, pueden dejar secuelas a medio y largo plazo, e impide la correcta maduración del sistema inmunitario. Los estudios enfocados en este tema han sido escasos hasta el momento pero se espera que aumenten notablemente en los próximos años debido a su indudable importancia científica y clínica (<http://www.efcni.org/>).

En este contexto, los objetivos de esta Tesis Doctoral han sido los siguientes:

1. Evaluar la diversidad bacteriana del contenido gástrico, del meconio y de las heces de niños prematuros durante su permanencia en la UCIN mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo.
2. Caracterizar el potencial patogénico de los grupos bacterianos mayoritarios en el tracto gastrointestinal de prematuros, tanto durante su permanencia en la UCIN como al cumplir los 2 años.
3. Determinar la composición microbiológica, inmunológica y bioquímica del calostro y de la leche de madres de recién nacidos prematuros.

4. Evaluar si la administración de *Bifidobacterium breve* PS12929 y *Lactobacillus salivarius* PS12934, dos cepas probióticas aisladas de leche humana, son capaces de ejercer una modulación microbiológica e inmunológica en prematuros de peso muy bajo o extremadamente bajo al nacer.

II. Introducción



problemas que presentan estos niños suele ser mayor cuanto menores son la EG y el PN, por lo que ambos parámetros son relevantes en la práctica. Conviene señalar que el PN es un indicador del correcto desarrollo fetal, cuyo valor óptimo se enmarca entre 2.500 y 4.000 g.

Los avances en los cuidados obstétricos y neonatales han permitido un aumento significativo en la supervivencia de los niños prematuros en las últimas décadas y, en consecuencia, el límite de viabilidad ha bajado de las 28 semanas de gestación en la década de los 60 a las 22-24 semanas en la actualidad (Grzona, 2006; Hankins et al., 2013; Powell et al., 2012) (Fig. 1). Por otra parte, el inicio de la gestación se suele medir a partir de un parámetro tan poco preciso como el final de la última menstruación (Blencowe et al., 2013; Dupont-Thibodeau et al., 2014; Hankins et al., 2013), lo que hace que, en muchas ocasiones, no sea posible establecer con exactitud la EG del feto. El empleo de ultrasonidos tiene un error de 7 a 10 días en la determinación de la EG (Brunkhorst et al., 2014) y de hasta 160 g en la del peso del feto (Stout et al., 2014). La imprecisión de estas medidas es crítica considerando los límites de viabilidad y dificulta la toma de decisiones cuando aparecen complicaciones durante el embarazo. Este hecho es responsable, en gran medida, de la polémica desatada en los últimos años sobre la eticidad de poner en marcha los recursos médicos, tecnológicos y económicos necesarios para la reanimación y cuidado de niños en el límite de viabilidad.

En el contexto de la prematuridad, el término "viabilidad" se suele definir como la edad de maduración fetal que asegura una oportunidad razonable ($\geq 50\%$) de supervivencia extraútero con soporte tecnológico (Powell et al., 2012). Sin embargo, esta definición plantea situaciones muy diferentes en función de las condiciones socioeconómicas en las que se produce el nacimiento. Así, en países desarrollados, donde hay acceso a las UCIN, el límite de viabilidad se sitúa en torno a las 24 semanas de gestación mientras que asciende hasta la semana 34 en aquellos en vías de desarrollo y con escasez de recursos (Fig. 1).

Cada vez son más los centros que, siguiendo los principios éticos de autonomía, justicia, beneficencia y no maleficencia, establecen un protocolo de actuación que facilita la toma de decisiones cuando el nacimiento se produce entre las semanas 22 y 25 de gestación, en la llamada "zona gris" o "zona experimental" (Chervenak y McCullough, 2013; Powell et al., 2012). Estos protocolos pueden variar entre centros pero, en general, presentan muchas similitudes. Entre ellas destaca el consenso en la consideración de varios factores, además de la EG o el PN, para poner en marcha la resucitación pediátrica, incluyendo el sexo del recién nacido (RN), la presencia de asfixia, hipotermia, apnea o bradicardia al nacer, la atención por personal médico especializado y el interés de los padres (Grzona, 2006; Hankins et al., 2013). En este sentido, algunos autores consideran imprescindible establecer un límite de viabilidad considerando que *"no todo lo técnicamente posible es éticamente"*

correcto" y que "la lucha por la vida ha de tener unos límites racionales y humanos" (Grzona, 2006), mientras que otros estiman innecesarios estos protocolos y potencian la consideración individual de cada paciente y situación familiar (Dupont-Thibodeau et al., 2014).

II. 1. 2. Incidencia

Cada año, unos 15 millones de RN en el mundo (>10% de los nacimientos) nacen demasiado pronto, según el reciente informe "Nacido Demasiado Pronto: Informe de Acción Global sobre Nacimientos Prematuros" (OMS, 2012). Más de un millón de estos niños mueren poco después del nacimiento; muchos otros sufren algún tipo de discapacidad física, neurológica o educativa, a menudo con un elevado coste para las familias y la sociedad (Blencowe et al., 2012b). De hecho, la prematuridad constituye la primera causa de mortalidad en el primer mes de vida y la segunda (tras la neumonía) entre los niños menores de 5 años (Liu et al., 2012).

El 84% de los nacimientos prematuros (>12 millones de de nacimientos anuales) tienen lugar entre las semanas 32 y 37 de gestación. El 11% (>1,5 millones) lo hacen entre las semanas 28 y 32, mientras que los prematuros extremos representan, aproximadamente, el 5% restante (>0,75 millones) (Brunkhorst et al., 2014; OMS, 2012; Powell et al., 2012). Las tasas de prematuridad varían considerablemente en función del país, oscilando entre cifras de alrededor del 5% de los nacimientos en diversos países europeos y de hasta un 18% en algunos países africanos (Fig. 2).

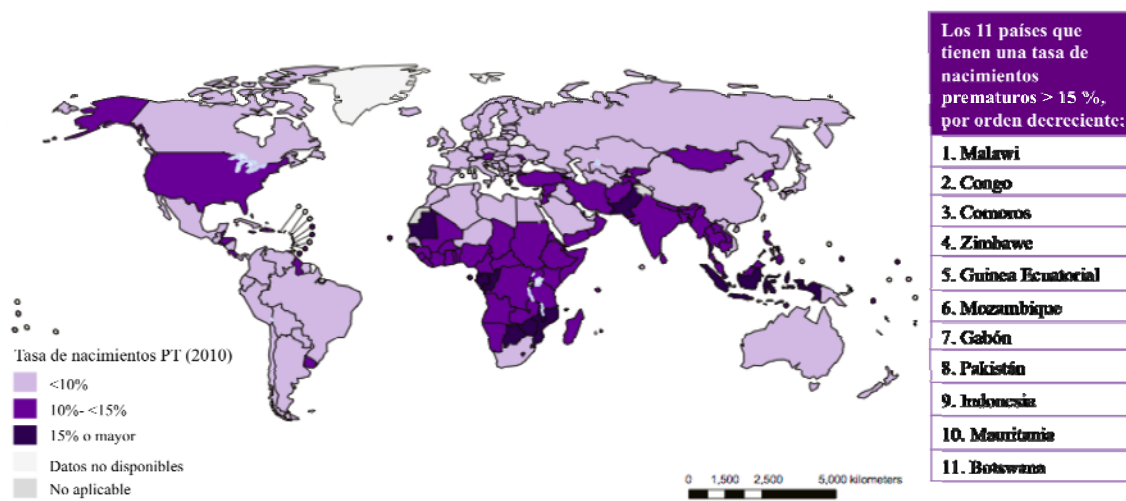


Figura 2. Tasas de prematuridad en el mundo en el año 2010. Fuente: OMS (2012).

El número de partos prematuros (PPT) y nacimientos de bajo peso ha aumentado de forma continuada en las últimas décadas (Beck et al., 2010; Blencowe et al., 2012a; Mandy et al., 2011). La probabilidad de que se

desencadene un PPT es particularmente elevada en el caso de embarazos múltiples (50% en embarazos dobles y 90% en embarazos triples), contribuyendo con un 18% a la tasa global de prematuridad (Mandy et al., 2011; Moutquin, 2003). El aumento de partos múltiples causado, al menos en parte, por la expansión del uso de técnicas de reproducción asistida, ha contribuido a la mayor tasa de prematuridad observada en los últimos años.

En Europa, la tasa de prevalencia de PPT oscila entre un 5,5% (Irlanda) y un 11,4% (Austria) de todos los neonatos, con una media del 7,1%, según el informe *EU Benchmarking Report* publicado por la Fundación Europea para el Cuidado de los Neonatos (*European Foundation for the Care of Newborns Infants*, EFCNI) (EFCNI, 2011). Este informe, presentado por primera vez en el Parlamento Europeo el 6 de mayo de 2010, y actualizado en noviembre de 2011, revela el impacto de la prematuridad en 14 países europeos (Austria, Bélgica, República Checa, Dinamarca, Francia, Alemania, Italia, Irlanda, Holanda, Polonia, Portugal, España, Suecia y Reino Unido) y muestra una preocupante falta de iniciativas políticas nacionales y europeas para prevenir el PPT y mejorar la calidad del cuidado de los RN prematuros. El informe también muestra que el número de nacimientos prematuros ha aumentado en Europa. Por ejemplo, la prematuridad aumentó en Portugal un 32% durante el período 2004 - 2008 (de 6,8% en 2004 al 9,0% en 2008); en Austria se registró un aumento similar del 8,1% en 1991 al 11,1% en 2008; y en España el número de RN prematuros pasó de 17.000 casos en 1997 a 40.281 en 2007 (Fig. 3). En el Reino Unido el número de nacimientos extremadamente prematuros aumentó en un 30% entre 1995 y 2006. Sobre la base de las conclusiones del informe, se plantearon cuestiones importantes a tener en cuenta para las políticas futuras de la Unión Europea (UE). Entre ellas, la UE debería:

1. Reconocer el creciente desafío de la prematuridad en Europa y su impacto significativo en la morbilidad y mortalidad infantil y reconocer las desigualdades sociales y de salud relacionadas con la prematuridad que existen entre los estados miembros de la UE. La salud de los prematuros está actualmente ausente en el desarrollo de políticas de salud y sociales de la UE, una observación sorprendente dada la prevalencia y el aumento de los PPT y sus complicaciones en Europa.

2. Demostrar el compromiso de la UE para mejorar la salud neonatal a través del desarrollo e implementación de las políticas sanitarias y sociales coordinadas dentro de la UE. La UE tiene un papel esencial que desempeñar en la mejora de la salud neonatal en Europa.

3. Dar prioridad y destinar fondos de la UE para promover la investigación destinada a mejorar la prevención, el tratamiento y la atención de los nacimientos prematuros y apoyar el establecimiento de redes europeas. Incluir la perinatología y la neonatología como áreas prioritarias clave de la investigación en salud financiada por la UE.

Los nacimientos prematuros deberían ser una prioridad para la Salud Pública en los países desarrollados, debido a su elevada prevalencia, al impulso que este tema ha recibido por parte del personal médico y al indudable impacto emocional y económico asociado. En estos países, la mejora del cuidado de los prematuros condujo al desarrollo de la neonatología como una subespecialidad médica y al establecimiento de las UCIN. En Estados Unidos, por ejemplo, cerca del 12% de los niños nacidos en 2010 fueron prematuros, una tasa que ha aumentado en un 30% desde 1981 (Miniño y Murphy, 2012). Además, se trata de un problema que lleva aparejado un coste económico importante (McCormick et al., 2011; Soilly et al., 2014). En ese mismo país, el coste económico anual asociado con el PPT fue de más de 26.200 millones de dólares (51.600 \$ por niño) en el año 2005. Durante ese mismo año, el coste médico medio (incluyendo atención hospitalaria y ambulatoria) durante el primer año de vida fue 10 veces mayor para los prematuros (32.325 \$) que para los RN a término (3.325 \$). La estancia media en el hospital fue nueve veces más prolongada para un RN prematuro (13 días) que para un RN a término (1,5 días) (Institute of Medicine, 2007). Los gastos para los padres son también notablemente mayores en el caso de nacimientos prematuros.

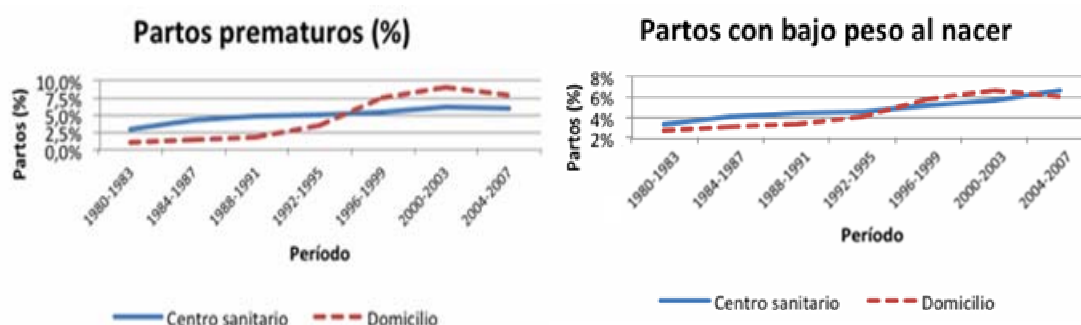


Figura 3. Evolución de las tasas de prematuridad y bajo peso al nacer en España entre 1980 y 2007. Fuente: Camargo y Bernis (2013).

El PPT también suele estar acompañado de un coste emocional y económico para las familias, incluyendo la pérdida de oportunidades sociales y laborales, a lo que se suma una mayor dificultad para mantener el empleo (Cronin et al., 1995; Macey et al., 1987; Saigal et al., 2000; Singer et al., 1999; Taylor et al., 2001). A menudo, el nacimiento y la hospitalización de los niños prematuros están asociados con distrés y depresión maternal, paternal y/o familiar (Davis et al., 2003; Eisengart et al., 2003; Singer et al., 2003); el nivel de estrés es mucho mayor en el caso de niños de muy bajo o extremadamente bajo PN, incluyendo percepciones de menor competencia parental y una

mayor dificultad para establecer apego con el niño (Taylor et al., 2001). No obstante, ciertas mejoras, como la extensión del método canguro (del que se hablará posteriormente), pueden mejorar significativamente la situación. Por otra parte, el cuidado de un niño prematuro puede contribuir a reforzar los lazos familiares (Saigal et al., 2000).

En casi todos los países con datos contrastados, las tasas de PPT han permanecido constantes o han crecido en los últimos años; un hecho que, unido al incremento de la población, significa un mayor número de prematuros cada año (Blencowe et al., 2012b; Chang et al., 2013). A este hecho también ha contribuido, en los países desarrollados, el aumento de neonatos con EG extremadamente baja (24-26 semanas), con un 80% de supervivencia para los nacidos a las 25 semanas (Blencowe et al., 2012b). En este sentido, a pesar de la reducción en el riesgo de secuelas en prematuros europeos de cualquier EG, el número absoluto de supervivientes con parálisis cerebral no ha cambiado debido al aumento de la supervivencia de los niños más prematuros (EG <26 semanas) (Moore et al., 2012; Platt et al., 2007).

II. 1. 3. Causas de prematuridad

La frecuencia de PPT no ha disminuido en los últimos años y eso puede asociarse, en parte, a la aparición de situaciones de riesgo como el aumento de la media de edad en la que las mujeres tienen su primer hijo y el uso cada vez más frecuente de técnicas de reproducción asistida que se asocian, como se ha comentado anteriormente, a una mayor probabilidad de gestación múltiple y, en consecuencia, de PPT. A pesar de que existen muchos factores que se han relacionado con una mayor probabilidad de PPT, resulta igualmente cierto que muchos niños que nacen prematuramente no tienen ninguno de esos antecedentes; en otras palabras, una madre joven, sin problemas médicos importantes y con un embarazo controlado puede tener un PPT. En consecuencia, es necesario conocer los factores que causan o predisponen a un PPT (Crider et al., 2005). La identificación de los factores de riesgo del PPT antes de la concepción o al comienzo del embarazo podría ayudar a prevenir esta complicación aplicando las intervenciones adecuadas.

Los nacimientos prematuros pueden dividirse en dos grandes categorías: aquellos que son espontáneos por inicio precoz del parto o ruptura prematura de las membranas y aquellos que son inducidos por el personal médico (Goldenberg et al., 2012) (Tabla 1).

Tabla 1. Tipos de partos prematuros, factores de riesgo asociados e intervenciones que se pueden realizar para su prevención. Fuente: OMS (2012).

Tipo	Factores de riesgo	Ejemplos	Intervenciones
Parto prematuro espontáneo	Edad de la gestante y tiempo entre embarazos	Embarazos en adolescentes Madres añosas Intervalos cortos entre embarazos	Planificación familiar en la adolescencia y también entre embarazos
	Embarazo múltiple	Embarazo gemelar Embarazos por reproducción asistida	Mejora de la práctica en la reproducción asistida
	Infección	Corioamnionitis Infección urinaria Malaria VIH Sífilis Vaginosis bacteriana	Programas de educación sexual para la prevención y el tratamiento de estas infecciones antes del embarazo Aplicación de intervenciones específicas para el diagnóstico precoz y el tratamiento de las infecciones que sucedan durante el embarazo
	Enfermedad médica crónica materna subyacente	Diabetes HTA ^a Anemia Asma Enfermedad tiroidea	Mejorar el control antes del embarazo y durante el mismo
	Nutrición	Malnutrición Obesidad Déficits de micronutrientes	
	Estilo de vida y trabajo	Tabaco Alcohol Drogas de abuso Exceso de actividad física o laboral	Intervenciones comunitarias y conductuales dirigidas hacia las mujeres en edad fértil, basándose en la prevención prenatal mediante diagnóstico precoz y tratamiento de las complicaciones del embarazo
	Salud mental materna	Depresión Maltrato	
	Genética y otros	Riesgo genético (como la historia familiar de incompetencia cervical)	
Parto prematuro provocado	Inducción médica o cesárea, por: Indicación obstétrica Indicación fetal	Existe relación entre los factores de riesgo de PPT espontáneo y la indicación del PPT provocado	Políticas y programas para reducir la práctica de cesáreas que no tengan indicación médica
	Otras causas no médicas		

HTA^a: Hipertensión Arterial

II. 1. 3. 1. Partos prematuros espontáneos

El PPT espontáneo es un proceso multifactorial aunque su causa última permanece desconocida hasta en un 50% de los casos (Menon, 2008). A continuación, se describen brevemente los principales factores descritos hasta la fecha.

En primer lugar, deben mencionarse los antecedentes familiares. La existencia de abortos, muertes fetales, cerclaje cervical o PPT en embarazos previos de la gestante constituyen uno de los principales factores de riesgo (Carlini et al., 2002; Varner y Esplín, 2005). Además, el hecho de que una mujer (y/o su pareja y/o familiares directos) haya sido prematura o haya tenido hijos prematuros constituye un fuerte factor de riesgo (Ananth et al., 2006; Bhattacharya et al., 2010; Bloom et al., 2001; Esplin et al., 2008) que, muy probablemente, esté asociado, a su vez, a factores de riesgo genéticos y epigenéticos (Plunkett y Muglia, 2008). En este sentido, se han descrito varios polimorfismos, generalmente relacionados con genes implicados en la biosíntesis de citoquinas, metalopeptidasas, receptores de tipo toll (TLR, del inglés *Toll Like Receptors*) o factores de coagulación, que pueden afectar negativamente al desarrollo del embarazo (Cridler et al., 2005; Engel et al., 2005; Härtel et al., 2005).

La edad de la madre también marca una diferencia significativa en las posibilidades de tener un PPT, siendo el riesgo más alto en mujeres muy jóvenes (<18 años) o muy mayores (>35 años) (Blondel y Kaminski, 2002; Jacobsson et al., 2004) (Fig. 4). Por ejemplo, la tasa de nacimientos prematuros en Estados Unidos es del 11 - 12% para las mujeres entre 20 y 35 años, mientras que es mayor del 15% para las mujeres menores de 17 años o mayores de 40 años (OMS, 2012). El papel de la raza como factor de riesgo de PPT ha sido ampliamente debatido y existe evidencia de que el periodo gestacional normal puede variar dependiendo del grupo étnico (Ananth et al., 2006). Tradicionalmente se ha considerado que esta variación estaba ligada a factores socioeconómicos o al estilo de vida, pero estudios recientes sugieren que los factores genéticos pueden jugar un papel relevante. Así, los neonatos con ancestros procedentes del África Subsahariana tienden a nacer antes que los niños caucásicos (Patel et al., 2004; Steer, 2005) pero padecen menos SDRA (Farrell y Wood, 1976), tienen una menor mortalidad neonatal (Alexander et al., 2003) y es menos probable que requieran una atención especial (Steer, 2005).

Otros factores maternos asociados con un mayor riesgo de PPT espontáneo son los intervalos cortos entre embarazos, un índice de masa corporal muy elevado (>30) o muy bajo (<18,5) previo a la concepción (Cedergreen, 2004; Goldenberg et al., 2008; Muglia y Katz, 2010) o los embarazos múltiples, que aumentan casi 10 veces el riesgo de PPT en comparación con los embarazos únicos (Blondel et al., 2006). Las tasas de embarazos múltiples naturales varían, dependiendo de las poblaciones, entre

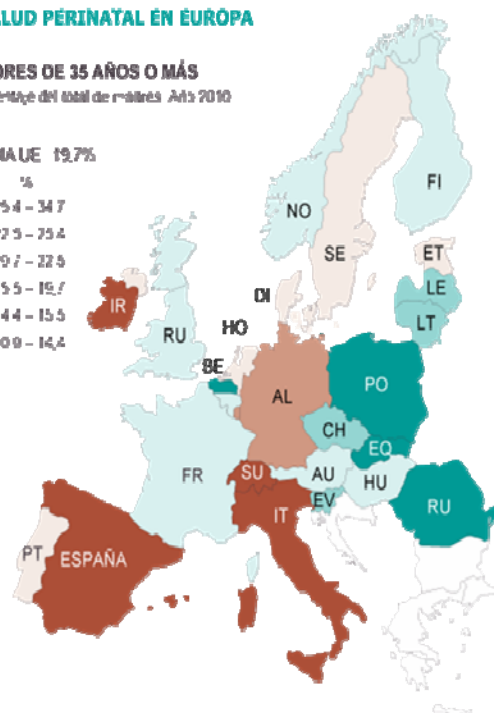
un 2,5% en África Occidental y un 0,5% en Japón. Sin embargo, el progresivo aumento de la edad materna durante el embarazo y la creciente disponibilidad de los servicios de reproducción asistida en los países desarrollados ha provocado un gran aumento en el número de nacimientos de gemelos y trillizos (Felberbaum, 2007). Por ejemplo, la tasa de gemelos aumentó más de un 50% en Reino Unido, Francia, Corea del Sur y Estados Unidos entre 1975 y 1998 (Blondel y Kaminski, 2002). La Figura 5 muestra la evolución de la tasa de gestaciones múltiples en España entre 1998 y 2010. Más recientemente, la Sociedad Española de Fertilidad registró un 22,3% de partos múltiples entre los resultantes de tratamientos de fertilidad durante el año 2012. La práctica de limitar el número de embriones transferidos durante la fertilización *in vitro* ha comenzado a revertir esta tendencia en algunos países (Kaprio y Marttila, 2005) mientras que, en otros, la tasa de partos gemelares ha seguido aumentando (Lim, 2011; Martín et al., 2010).

LA SALUD PERINATAL EN EUROPA

► MADRES DE 35 AÑOS O MÁS Porcentaje del total de madres Año 2010

MEDIA UE 19,7%

%
25,4 - 34,7
22,5 - 25,4
19,7 - 22,5
15,5 - 19,7
14,4 - 15,5
10,9 - 14,4



► BEBÉS NACIDOS CON BAJO PESO Porcentaje del total de recién nacidos en 2010 Menos de 7 500 gramos

MEDIA UE 8,5%

%
8,3 - 9,8
7,3 - 8,3
6,5 - 7,3
5,1 - 6,5
4,3 - 5,1
3,4 - 4,3

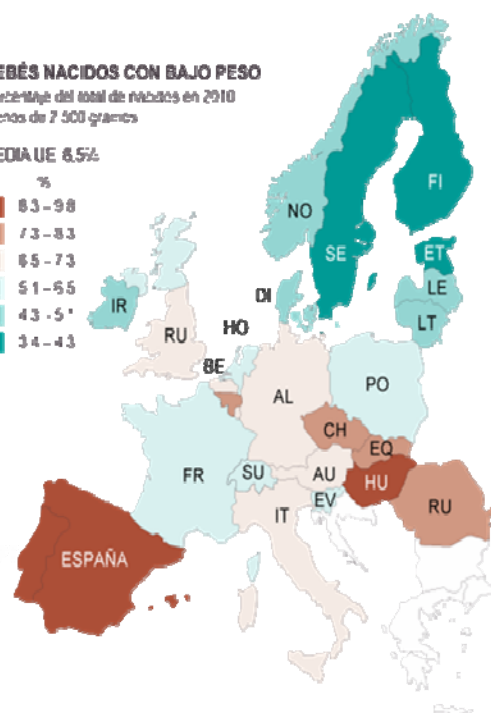


Figura 4. Tasas de madres mayores de 35 años y su relación con recién nacidos de bajo peso al nacer. Fuente: The European Perinatal Health Report (2010).

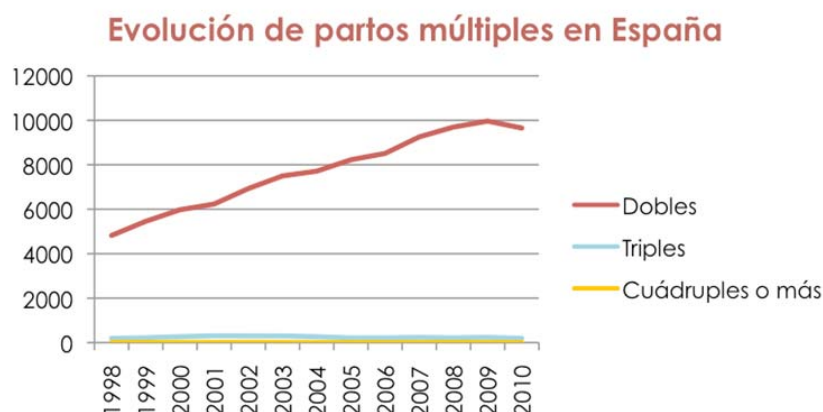


Figura 5. Evolución de la tasa de partos múltiples en España entre 1998 y 2010.
Fuente: Instituto Nacional de Estadística, INE (2010).

Las infecciones e infestaciones maternas y/o fetales juegan un papel muy relevante entre los factores que conducen a un PPT. Las infecciones del tracto genitourinario, las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y otras enfermedades de transmisión sexual (gonorrea, sífilis...), las infecciones periodontales y la malaria se incluyen entre las que se han asociado a un mayor riesgo de prematuridad (Goldenberg y Culhane, 2006; Gonçalves et al., 2002; Gravett et al., 2010; Leitich et al., 2003; Michalowicz et al., 2006; Wang et al., 2013). Las hipótesis que se barajan para explicar la infección fetal incluyen el ascenso de microorganismos desde la vagina o cuello uterino, la infección transplacentaria, el ascenso de microorganismos desde el peritoneo a las trompas de Falopio o la introducción accidental de microorganismos en procedimientos como la amniocentesis (muestreo de líquido amniótico) o el muestreo de sangre fetal (Gonçalves et al., 2002). Entre los microorganismos más frecuentemente encontrados en el líquido amniótico de niños nacidos prematuramente destacan los de los géneros *Ureaplasma*, *Fusobacterium*, *Mycoplasma*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Gardnerella* (Gonçalves et al., 2002; Hitti et al., 1997; Seliga-Siwecka y Kornacka 2012).

El estado nutricional materno también es un factor que puede resultar determinante en el curso de un embarazo, considerándose como factores de riesgo de prematuridad las carencias en vitaminas B₆ y B₁₂, folatos, hierro y zinc (Goldenberg et al., 2008; Murphy, 2007) o el exceso de homocisteína (Murphy, 2007). Otros factores que predisponen al PPT espontáneo están relacionados con el estilo de vida, incluyendo el estrés (Baibazarova et al., 2013; Fukushima et al., 2005; Hnat et al., 2005) (Fig. 6), un esfuerzo físico excesivo, la exposición a temperaturas extremas (Dadvand et al., 2011; Schifano et al., 2013; Strand et al., 2011; Vicedo-Cabrera et al., 2014; Wang et al., 2013) o pasar largos periodos de tiempo de pie (Muglia y Katz, 2010). El tabaquismo y el consumo

excesivo de alcohol también se han asociado con un mayor riesgo de PPT (Gravett et al., 2010).

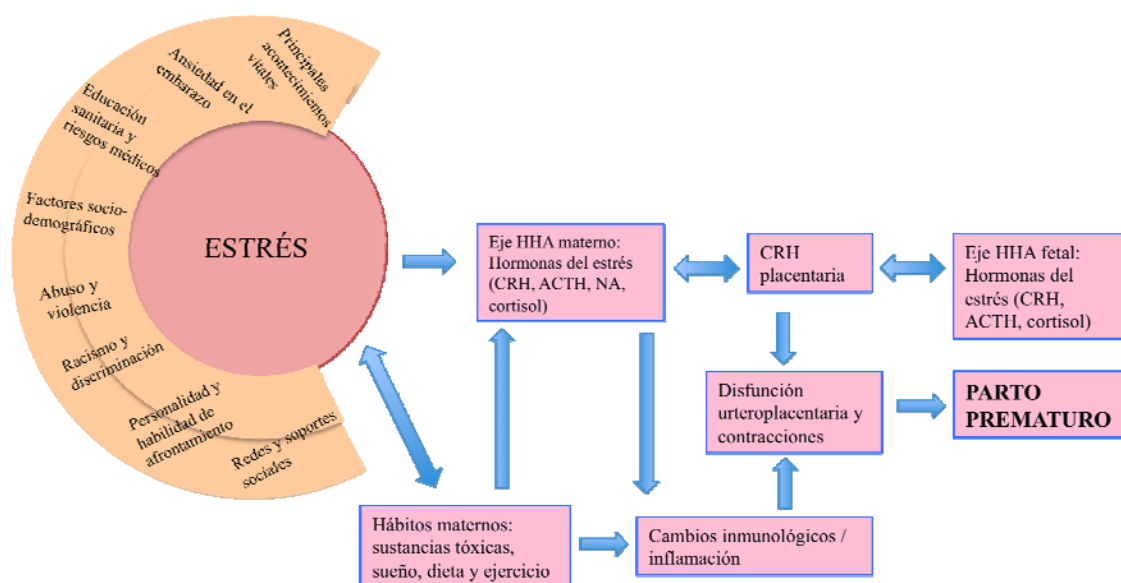


Figura 6. Respuesta fisiológica al estrés en relación al parto pretérmino. Adaptado de Dunkel-Schetter (1998). ACTH, hormona adrenocorticotropa (del inglés, *Adrenocorticotropic hormone*); CRH, hormona liberadora de corticotropina (del inglés, *Corticotropin-releasing hormone*); HHA, hipotalámico-hipofisario-adrenal; NA, noradrenalina.

Por otra parte, el nacimiento prematuro es más frecuente en los niños (~55%) que en las niñas (Zeitlin et al., 2002) y, además, el riesgo de morir en los varones prematuros es mayor que en las hembras con la misma EG (Kent et al., 2012).

Finalmente, la microbiota materno-fetal también podría jugar un papel relevante como factor predisponente/descadenante o como factor protector con relación al PPT. Hasta hace relativamente pocos años, la placenta y los tejidos u órganos relacionados con el feto o el crecimiento fetal eran considerados microbiológicamente estériles en condiciones fisiológicas y, en consecuencia, no se otorgaba a los microorganismos ningún papel relevante en la reproducción humana. Sin embargo, varios estudios han puesto de manifiesto la presencia de diversos grupos bacterianos en la placenta, líquido amniótico y sangre del cordón umbilical en embarazos desarrollados sin ningún tipo de complicación médica (Aagaard et al., 2014; Jiménez et al., 2005; Steel et al., 2005; Stout et al., 2013). Aunque todavía desconocido, estos y otros trabajos sugieren que los microorganismos podrían desempeñar un papel fundamental en el establecimiento y evolución del embarazo y en el desencadenamiento del parto (Pelzer et al., 2013; Reid et al.,

2014; Salah et al., 2013). Sin duda se trata de un campo de investigación que promete importantes descubrimientos en los próximos años.

La presencia de factores de riesgo puede advertir de la posibilidad del PPT pero ninguno de ellos resulta decisivo para su diagnóstico por lo que actualmente no existen marcadores adecuados de prematuridad (Varner y Espín, 2005). Los distintos factores pueden establecer interacciones complejas cuyo resultado es, a menudo, difícilmente predecible (Fig. 7).

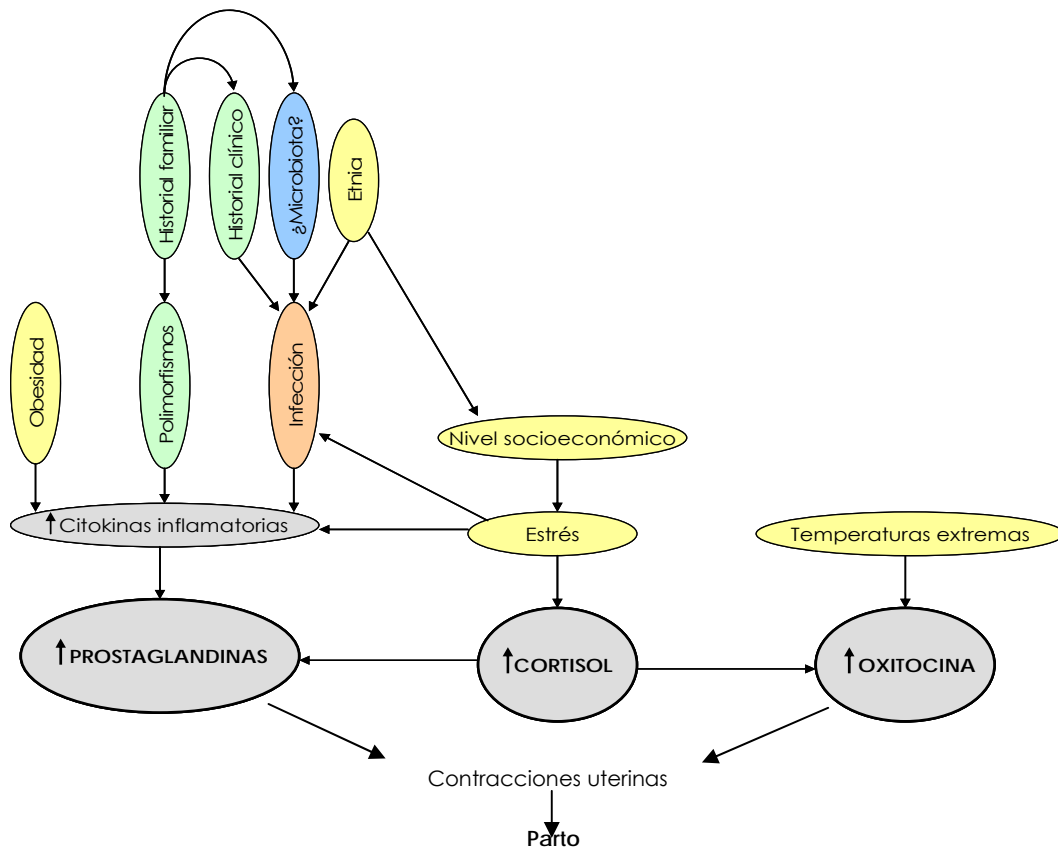


Figura 7. Posibles interacciones entre diversos factores de riesgo del parto prematuro.

II. 1. 3. 2. Partos prematuros inducidos

El número de los nacimientos prematuros inducidos es aún más variable dependiendo del país. Así, la cifra es muy reducida en los países que poseen las mayores tasas de morbilidad y mortalidad neonatal ya que, por una parte, son escasas las mujeres a las que se les hace un seguimiento del embarazo y, por otra, las tasas de cesáreas son bajas (menor del 5% en la mayoría de los países africanos) (Blencowe et al., 2012a). En los países desarrollados suele suceder lo contrario y, en este caso, las cesáreas constituyen la principal causa de nacimiento prematuro inducido (Fig. 8).

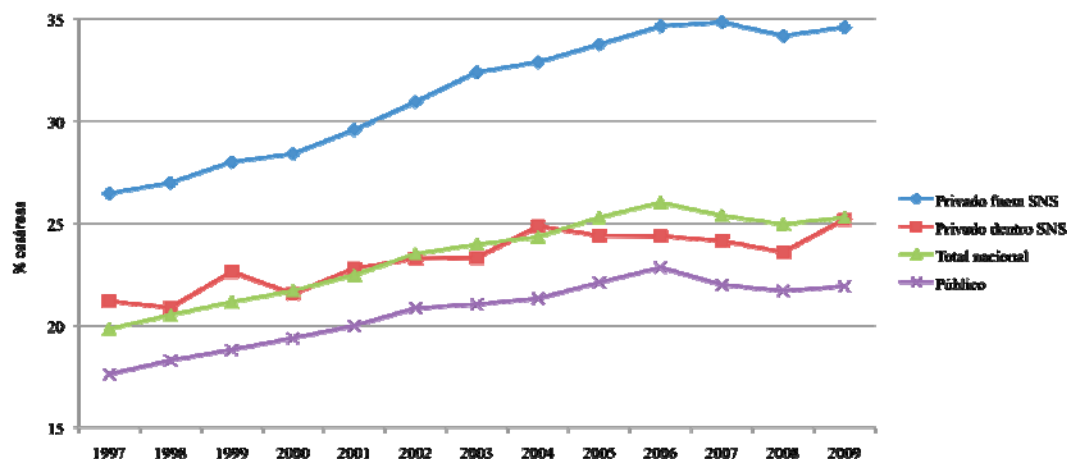


Figura 8. Evolución del porcentaje de cesáreas en España desde 1997 hasta 2009. Fuente: Ministerio de Sanidad (2012). SNS: Sistema Nacional de Salud.

En 1985, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró que no existía justificación médica para que las tasas de cesáreas fuesen mayores del 10-15% en cualquier región del planeta (OMS, 1985). Tres décadas después, el establecimiento de una tasa óptima de nacimientos por cesárea sigue siendo controvertido, tanto en los países desarrollados como en los que están en vías de desarrollo (Peskin y Reine, 2002). La proliferación de cesáreas en muchos países desarrollados ha conducido a la búsqueda de estrategias para reducir su número ante la evidencia de que las tasas elevadas no sólo no suponen ningún beneficio adicional para la salud sino que, a escala poblacional, pueden aumentar los riesgos para la madre (incluso en futuros embarazos) (Fig. 9) y tienen un impacto económico mucho más alto para los servicios de salud (National Collaborating Centre for Women's and Children's Health UK, 2004; Thomas et al., 2001). En este sentido, más de la mitad de los PPT inducidos en Estados Unidos con una EG de 34 - 36 semanas de gestación se realizaron sin una indicación médica clara (Gyamfi-Bannerman et al., 2011). Además, una cesárea electiva puede resultar en un nacimiento prematuro no deseado debido a errores en la determinación de la EG (Mukhopadhyay y Arulkumaran, 2007). Paradójicamente, la infrutilización de las cesáreas es uno de los factores que explican la elevada mortalidad perinatal en los países en vías de desarrollo (Weil y Fernández, 1999).

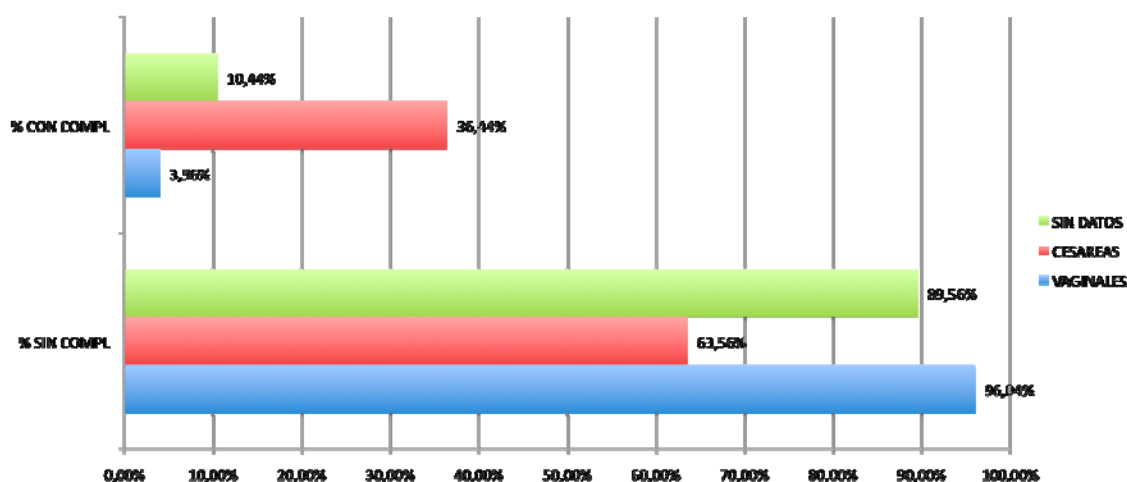


Figura 9. Porcentaje de complicaciones en los partos vaginales y cesáreas realizados en España en el año 2007. Fuente: Instituto Nacional de Estadística (INE).

Por otra parte, las causas clínicas que suelen requerir la inducción de un PPT se pueden dividir en maternas y fetales. Entre ellas, las más importantes son la preeclampsia severa, el desprendimiento prematuro de la placenta (*abruptio placentae*), la rotura uterina, la colestasis o colestasia del embarazo, el sufrimiento o distrés fetal y el retraso del crecimiento intrauterino o fetal (Ananth et al., 2006). Ciertas enfermedades o estados subyacentes de la madre (insuficiencia renal, hipertensión arterial (HTA), obesidad, diabetes...) aumentan el riesgo de complicaciones maternas (por ejemplo, la preeclampsia) y están asociadas a una mayor tasa de PPT. En este sentido, es muy probable que la epidemia mundial de obesidad y diabetes se convierta en un factor que contribuya de una forma cada vez más importante a las tasas de PPT. Resulta ilustrativo que, en un estudio realizado en el Reino Unido, el 17% de todos los RN de madres diabéticas fueron prematuros, un valor que duplicaba el de la población general (Steer, 2005). Tanto los factores maternos como los fetales son más frecuentes en los embarazos que se producen tras tratamientos de reproducción asistida, por lo que en esta subpoblación de mujeres aumenta el riesgo de PPT tanto espontáneo como inducido (Kalra y Molinaro, 2008; Mukhopadhyay y Arulkumaran, 2007).

II. 1. 4. Problemas de salud asociados al nacimiento prematuro

Existen tres mundos muy diferentes en los que un niño prematuro puede nacer y ese hecho resulta determinante en el tipo y consecuencias de los problemas que puede sufrir a corto y medio plazo (Blencowe et al., 2013):

(a) Países pobres con bajos recursos. Están asociados a una elevada tasa de mortalidad entre los niños prematuros, incluso entre los prematuros tardíos. De los, aproximadamente, dos millones de muertes anuales de prematuros, el

75% se producen en el Sudeste Asiático y en el África Subsahariana, donde la tasa de mortalidad neonatal de prematuros es seis veces mayor que en los países desarrollados. En estos escenarios, la reducción de la mortalidad sigue siendo el objetivo prioritario.

(b) Países con un nivel medio de ingresos, incluyendo países emergentes. Son países en los que se ha producido una reducción rápida de la tasa de mortalidad neonatal y en los que ha aumentado la disponibilidad de cuidados intensivos neonatales aunque la calidad de la atención es variable. Se caracterizan por un elevado índice de discapacidad entre los prematuros que sobreviven (por ejemplo, se estima que casi la mitad de los niños muy prematuros sobrevivientes en Asia Central y América Latina tienen alguna discapacidad a largo plazo). La mayoría de esas discapacidades se podrían prevenir con una mejora de la calidad de la atención postnatal.

(c) Países desarrollados o de altos ingresos. Tienen una tasa de mortalidad neonatal muy baja y poseen políticas sólidas de cuidados pre- y postnatales que evitan o reducen las complicaciones y secuelas. Para estos países, el foco de atención en los últimos años han sido los prematuros extremos (<26 semanas), ya que son los que conllevan una mayor morbilidad y mortalidad y plantean cuestiones morales y éticas complejas.

En cualquier caso, la inmadurez anatómica y/o funcional de los RN prematuros hace que el riesgo de que padezcan complicaciones o que tengan secuelas a corto, medio y largo plazo sea mucho mayor que el de los nacidos a término (Eichenwald y Stark, 2008) (Fig. 10). Este riesgo aumenta a medida que disminuye la EG y el PN. Por lo tanto, los niños que son muy prematuros (≤ 25 semanas de gestación), o que tienen muy bajo o extremadamente bajo PN, son los que presentan las tasas más altas de mortalidad y, si sobreviven, son los que tienen mayor riesgo de problemas a *posteriori*. Así, en un estudio del Instituto Nacional de Salud Infantil de Estados Unidos se observó que las complicaciones a corto plazo más frecuentes, entre 8.515 niños con extremadamente bajo PN, fueron el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) (93%), la retinopatía del prematuro (59%), la presencia de conducto arterioso permanente (CAP) (46%), la displasia broncopulmonar (DBP) (42%), las sepsis tardías (36%), la enterocolitis necrotizante (NEC) (11%) y las hemorragias intraventriculares de grado III y IV (7 y 9%, respectivamente) (Stoll et al., 2010).

A pesar de que el riesgo de complicaciones disminuye con la EG, la morbilidad de los prematuros tardíos sigue siendo significativamente más elevada que la de los nacidos a término. En este sentido, en un estudio reciente que incluía 6.674 niños prematuros suecos con una EG entre 30 y 34 semanas se observó una elevada frecuencia de diversas complicaciones, como hiperbilirrubinemia (59%), enfermedad respiratoria aguda (28%), hipoglucemia (16%) e infecciones bacterianas (15%) (Altman et al., 2011).

La adecuada estabilización inicial de un RN prematuro en la sala de partos es un factor clave para reducir el riesgo de complicaciones (Niermeyer et al., 2000). Los prematuros corren mayor riesgo de sufrir hipotermia al nacer, debido a su gran superficie relativa y a su incapacidad para generar suficiente calor. La hipotermia puede contribuir a trastornos metabólicos tales como la hipoglucemia o la acidosis. En prematuros de menos de 26 semanas de EG, la hipotermia se asocia con una mayor mortalidad y, en los supervivientes, con cuadros de insuficiencia pulmonar (Costeloe et al., 2000). Por tales motivos, los RN prematuros requieren intervenciones adicionales al protocolo estándar de prevención de hipotermias neonatales en la sala de partos. Estas intervenciones se basan en crear barreras para evitar la pérdida de calor (mantas, bolsas de polietileno/poliuretano...) o en recurrir a fuentes de calor externas (contacto piel con piel, colchón transmisor de calor...) (Ibrahim y Yoxall, 2010; McCall et al., 2010; Trevisanuto et al., 2010). Una vez en la UCIN, los RN prematuros deben ser atendidos en una incubadora, cuna térmica o mediante el método madre canguro (que se tratará posteriormente) para evitar la hipotermia.

Inmediatamente después de su nacimiento, los RN prematuros deben disponer de una monitorización continua de la respiración y la frecuencia cardíaca. También se debe medir el nivel de oxígeno en sangre para evitar las consecuencias de la hipoxia o hiperoxia. Las complicaciones respiratorias más frecuentes asociadas a la prematuridad son (a) SDRA, causado por deficiencia de surfactante; (b) la DBP o enfermedad pulmonar crónica, una enfermedad respiratoria que se presenta comúnmente como una complicación tardía en los neonatos con muy bajo PN y que se define como la dependencia de oxígeno a las 36 semanas de EG; y (c) la apnea del prematuro. El impacto de las complicaciones respiratorias ha disminuido considerablemente en las últimas décadas con la administración de corticoesteroides antenatales, que aceleran la madurez pulmonar, y de surfactante tras el nacimiento. No obstante, los problemas respiratorios siguen constituyendo uno de los grandes retos de la prematuridad (Gibson, 2007; Mandy et al., 2011; Ward y Beachy 2003).

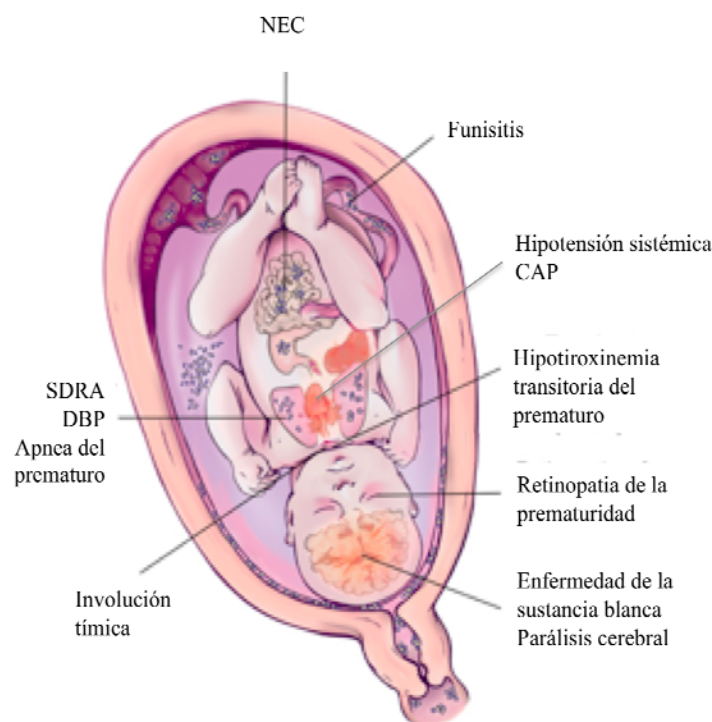


Figura 10. Principales problemas de salud asociados a la prematuridad. Fuente: Adaptado de Gantert (2010). CAP, Conducto Arterioso Persistente; DBP, Displasia Broncopulmonar; NEC, enterocolitis necrotizante (del inglés, *Necrotizing Enterocolitis*); SDRA, Síndrome de Destrés Respiratorio Agudo.

Por lo que respecta a las complicaciones cardiovasculares, destacan la hipotensión sistémica (Barrington, 2011; Batton et al., 2012; Vain y Barrington, 2012), la hemorragia intraventricular (Fanaroff et al., 2007; Stoll et al., 2010) y el CAP (Fanaroff et al., 2007) (Fig. 11). Esta última enfermedad consiste en la permanencia, tras el nacimiento, de la comunicación entre las arterias pulmonar y aorta existente en el periodo fetal. Su función en el feto es reducir el flujo de sangre a unos pulmones que todavía no son funcionales. Afecta al 30% de los RN prematuros, en los que da lugar a un aumento de la circulación pulmonar y reducción de la sistémica, ocasionando apnea, SDRA e, incluso, fallo cardíaco (Mandy et al., 2011). El CAP es habitualmente tratado con inhibidores de la ciclooxygenasa, como el ibuprofeno. Este tratamiento puede conllevar la alteración de las plaquetas en el RN aumentando el riesgo de hemorragia intraventricular, por lo que su tratamiento requiere una evaluación previa de los niveles plaquetarios (Brunner et al., 2012).

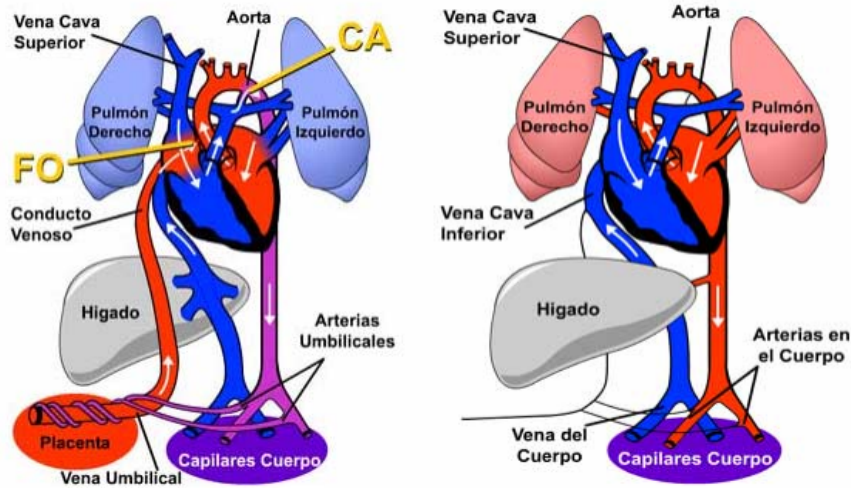


Figura 11. Anatomía y fisiología del corazón en el periodo fetal (izquierda) y en el neonatal (derecha). CA: Conducto arterioso; FO: Foramen oval. Fuente: www.pted.org

Por lo que respecta al aparato digestivo, su falta de madurez hace que los RN prematuros sean más susceptibles de sufrir intolerancias alimentarias y reflujo gástrico (Gouyon et al., 2012; Saigal y Doyle 2008; Shapiro-Mendoza et al., 2006). La intolerancia alimentaria es un término que hace referencia a la dificultad o imposibilidad para digerir ciertos nutrientes administrados por vía enteral (Fanaro, 2013), mientras que el reflujo gástrico puede definirse como el paso de contenido gástrico al esófago con o sin regurgitación o vómito. El tracto gastrointestinal (TGI) duplica su longitud en el último trimestre del embarazo, por lo que la superficie de absorción y, en consecuencia, la capacidad para asimilar nutrientes, se ve notablemente reducida en los niños prematuros. Estas complicaciones digestivas, junto a la dificultad de establecer un patrón nutricional adecuado para su crecimiento y desarrollo, pueden dar lugar a hipoglucemia en el RN (registrada en un 16% de los prematuros) que si no se regula de forma adecuada puede derivar en convulsiones o insuficiencia cardíaca (Mally et al., 2010; Mandy et al., 2011).

La inmadurez del hígado puede dar lugar a una elevada secreción de bilirrubina en sangre dando lugar a hiperbilirrubinemia e ictericia. Se trata de un trastorno bastante común que afecta a aproximadamente el ~60% de los prematuros y que generalmente se trata de forma efectiva con fototerapia, aunque en algunos casos sea necesario el tratamiento farmacológico. Es importante su detección temprana y controlar su evolución debido a su potencial neurotóxico (Mandy et al., 2011; Saigal y Doyle, 2008; Shapiro-Mendoza 2006).

La NEC afecta a más del 10% de los prematuros y es la causa más frecuente del síndrome del intestino corto en la infancia y una importante causa de mortalidad neonatal. Cursa con la necrosis y desprendimiento de la

pared intestinal, erosionando la mucosa hasta su perforación (Gibson, 2007; Mandy et al., 2011; Ward y Beachy, 2003). Su etiología continúa siendo desconocida aunque parece tener un origen multifactorial en el que la reducción de la motilidad intestinal, la alimentación con fórmulas infantiles y la alteración de la microbiota intestinal parecen jugar papeles clave. Esta patología se tratará más extensamente en apartados posteriores.

La parálisis cerebral afecta a entre un 5 y 15% de los RN prematuros y puede dar lugar a discapacidad motora, sensorial y cognitiva (Cabañas y Pellicer, 2008; Fawke, 2007). Las hemorragias intraventriculares afectan al 8% de los nacimientos prematuros y en el 30% de los casos están asociadas a hidrocefalia (Mandy et al., 2011). Los grados más graves pueden desencadenar infarto cerebral y hemiplejía espástica. La leucomalacia periventricular es la necrosis en la materia blanca del cerebro por isquemia o disminución del riego sanguíneo en la arteria cerebral. Su prevalencia es del 3% y suele conllevar diplejía espástica con afección intelectual y cognitiva (Mandy et al., 2011; Ward y Beachy, 2003). La inmadurez del sistema nervioso del prematuro también afecta al correcto funcionamiento de la glándula tiroides, por lo que es relativamente común que se produzca una hipotiroxinemia transitoria (Gantert et al., 2010).

La retinopatía del prematuro se debe a una vascularización incompleta de la retina, tiene una evolución irregular hasta las semanas 40 - 45 de EG y se resuelve espontáneamente en la mayoría de los casos (Marlow et al., 2005). Sin embargo, los prematuros con retinopatía grave tienen un mayor riesgo de discapacidad visual en el futuro.

El sistema inmunitario es uno de los más inmaduros en el neonato. En prematuros extremos, la transferencia trasplacentaria de anticuerpos maternos ha sido menor, ya que se trata de un proceso que se intensifica en el último trimestre del embarazo. El deficiente reconocimiento de patógenos, la limitada adhesión de los leucocitos al endotelio vascular (básica para su extravasación en los procesos inflamatorios) y la escasa eliminación bacteriana hace a los prematuros más susceptibles a las infecciones (Arunkumar et al., 2012). La larga permanencia en el ambiente hospitalario, que habitualmente requieren estos niños, también contribuye a la mayor presencia de sepsis en esta población, que puede alcanzar cifras de hasta el 36% (Gouyon et al., 2012; Mandy et al., 2011).

A pesar de todas las complicaciones que se manifiestan a corto plazo, la mayoría de los RN prematuros nacidos en nuestro entorno sobreviven sin daño alguno. Sin embargo, se estima que más de la mitad de los prematuros nacidos con una EG menor de 28 semanas y aproximadamente el 5% de los nacidos entre las 32 y las 36 semanas sufren a largo plazo algún problema de salud relacionado con la prematuridad (Escobar et al., 2006; Shapiro-Mendoza et al., 2008). Nuevamente, los promedios mundiales revelan importantes

diferencias regionales; en este sentido, resulta esclarecedor que el 52% de todos los nacidos vivos, el 60% de los nacimientos prematuros y el 75% de las muertes de neonatos prematuros se produzcan en el África Subsahariana y Asia Meridional. Esta elevada tasa de mortalidad entre prematuros hace que la cifra de aquellos que sobreviven y tienen alguna discapacidad sea, en comparación con las anteriores, relativamente baja (46%) (Blencowe et al., 2013). Por otra parte, un RN nacido vivo antes de las 32 semanas de gestación tiene una probabilidad del 53% de sobrevivir al periodo neonatal sin deterioro neurológico posterior en países desarrollados, mientras que la cifra baja al 27% si nació en el sur de Asia o en el África Subsahariana.

En cualquier caso, globalmente existe una tasa relativamente elevada de hospitalizaciones recurrentes, deterioro neurológico a largo plazo y diversas enfermedades crónicas entre los niños que nacieron prematuramente y sobrevivieron a los primeros meses de vida. En primer lugar, las hospitalizaciones recurrentes aumentan a medida que disminuye la EG y entre las causas más frecuentes de reingreso destacan los trastornos respiratorios, incluyendo infecciones respiratorias y asma, y los problemas gastrointestinales, como el reflujo gastroesofágico o las gastroenteritis (Boyle et al., 2012).

Numerosos estudios han descrito una asociación entre el PPT y un amplio abanico de secuelas neurológicas a largo plazo, incluyendo dificultades en el aprendizaje, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, autismo, ansiedad y trastornos emocionales, especialmente en los nacidos muy prematuros (Aarnoudse-Moens et al., 2009; Elgen et al., 2012; Johnson et al., 2010; Johnson y Marlow, 2011; Nosarti et al., 2012; Pinto-Martin et al., 2011), pero también en prematuros tardíos (de Jong et al., 2012; Quigley et al., 2012; Talge et al., 2010). El nacimiento prematuro, a cualquier EG, está igualmente asociado con problemas respiratorios, cardiovasculares, renales, reproductivos y metabólicos a largo plazo (Bacchetta et al., 2009; Bolton et al., 2012; Carmody y Charlton, 2013; Fawke et al., 2010; Hack et al., 2011; Keijzer-Veen et al., 2010; Kerkhof et al., 2012; Kotecha et al., 2012; Parkinson et al., 2013; Rotteveel et al., 2008; Swamy et al., 2008). Los niños muy prematuros también son más propensos a mostrar un crecimiento retrasado o más lento con respecto a los nacidos a término (Bocca-Tjeertes et al., 2011; Boyle et al., 2012; Bracewell et al., 2008).

II. 1. 5. Prevención

El desconocimiento de los agentes causales del PPT dificulta el establecimiento de unas pautas claras para prevenirlo. Las estrategias de prevención se pueden clasificar en primarias, secundarias y terciarias (Iams et al., 2008). La prevención **primaria** se dirige a todas aquellas mujeres en edad fértil y, en consecuencia, susceptibles de embarazo. La prevención **secundaria**

tiene como objetivo la detección precoz de factores de riesgo en las mujeres embarazadas con la finalidad de evitarlos o tratarlos. Por último la prevención **terciaria** incluye el tratamiento o prevención del PPT en aquella población que presenta síntomas de su desencadenamiento.

II. 1. 5. 1. Prevención del parto pretérmino antes del embarazo

El periodo previo al embarazo puede jugar un papel más importante de lo que muchas mujeres creen en la salud de la futura pareja madre-hijo. El cuidado durante el periodo de “preconcepción” incluye cualquier intervención que se proporciona a mujeres o parejas en edad reproductiva para identificar y modificar los riesgos biomédicos, conductuales y sociales que, en caso de embarazo, pueden afectar a la salud de la madre y de su hijo (Johnson et al., 2006).

El marco conceptual del cuidado durante este periodo incluye iniciativas que van desde la educación hasta los programas de vacunación o la suplementación con micronutrientes. Estas iniciativas deben promover, simultáneamente, la planificación familiar y las intervenciones para reducir los riesgos, permitiendo que las mujeres inicien el embarazo en el mejor estado de salud posible y, en consecuencia, tener las mayores posibilidades de tener un niño a término y sano.

Las medidas preventivas se inician con la prevención del embarazo durante la adolescencia, ya que el porcentaje de PPT es particularmente elevado en ese periodo de la vida. En este sentido, es importante que las mujeres conozcan y apliquen los medios más adecuados para evitar embarazos no deseados y, en consecuencia, puedan planificar su vida reproductiva. La planificación también debe incluir el tiempo transcurrido entre embarazos sucesivos ya que el riesgo de tener niños prematuros o de bajo PN aumenta cuando dicho periodo es menor de seis meses (Conde-Agudelo et al., 2006; Shah y Zao, 2009). Este hecho puede deberse a que las mujeres no tienen tiempo suficiente para recuperar sus reservas nutricionales o para tratar infecciones (urinarias, vaginales...) u otros problemas (diabetes gestacional, alteraciones tiroideas...) que suelen ser relativamente frecuentes durante el embarazo. Actualmente se considera como ideal un periodo entre gestaciones de 18 - 24 meses (Tsui et al., 2010).

Otro pilar de la prevención del PPT en el periodo previo al embarazo es una nutrición saludable que incluya, cuando se requiera, una fortificación con micronutrientes. Las malformaciones congénitas (defectos del tubo neural, del tracto urinario, de las extremidades, cardíacos...) son motivo de nacimiento pretérmino (Honein et al., 2009). En este sentido, la complementación

multivitamínica reduce el riesgo de este tipo de alteraciones en un 42 - 62% y el de preeclampsia en un 27% (Christianson et al., 2006; Dean et al., 2013).

La optimización del peso es otro factor relevante ya que tanto las mujeres con bajo peso antes del embarazo (índice de masa corporal $<18,5$ kg/m²) como aquellas con sobrepeso y obesas (índice de masa corporal >25 kg/m²) tienen un riesgo significativamente mayor de tener prematuros y/o RN de bajo PN (Han et al., 2011; McDonald et al., 2010; Torloni et al., 2009). La obesidad, en particular, es un problema de magnitud creciente a nivel mundial ya que alrededor de 300 millones de mujeres en edad reproductiva son obesas (OMS, 2011). Aunque la evidencia indica que, a cualquier edad, la pérdida de peso supone un reto difícil de conseguir y mantener, se debe promover que estas mujeres modifiquen sus hábitos dietéticos e incluyan una actividad física moderada en su rutina diaria, con la ayuda de programas motivadores hechos a la medida de cada mujer y un sistema de soporte adecuado (Dean et al., 2013; Gavard y Artal, 2008; Rock et al., 2010).

La vacunación de niñas, adolescentes y mujeres en edad fértil frente a infecciones que pueden tener consecuencias devastadoras durante o después del embarazo es otra medida importante para evitar futuros PPT. El virus de la rubéola es un buen ejemplo ya que, por una parte, aumenta el riesgo de prematuridad y, por otra, la infección congénita produce efectos teratogénicos, que incluyen desde el aborto espontáneo o la muerte fetal, al síndrome de rubéola congénita en el RN. En consecuencia, la rubéola es un importante problema de Salud Pública y se incluyó en el sistema español de Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO) en 1982. Desde hace años, la mayoría de los países de la Región Europea de la OMS utilizan en sus programas de vacunación bien la vacuna triple vírica (sarampión, rubéola y parotiditis) o la vacuna combinada de sarampión y rubéola. Desde la introducción de los programas de vacunación, la incidencia de rubéola ha mostrado una disminución progresiva en nuestro país, pasando de 9,73 casos por 100.000 habitantes en 1997 a 0,02 en 2011 (European Centre for Disease and Control, 2012).

La prevención de enfermedades infecciosas de transmisión sexual (ETS), en particular la sífilis, constituye toda una prioridad para reducir las tasas de mortinatos y de PPT, especialmente teniendo en cuenta su incidencia durante el embarazo de adolescentes. De hecho, las intervenciones centradas en los grupos de alto riesgo, incluyendo las mujeres en edad fértil, los adolescentes y los usuarios de drogas por vía intravenosa, parecen ser particularmente eficaces (Bhutta et al., 2011; Wasserheit y Aral, 1996).

El incremento de las relaciones sexuales sin protección aumenta la incidencia de las ETS entre los jóvenes y conduce a embarazos no deseados en adolescentes; a su vez, ambos factores favorecen la presencia de un PPT (Fig. 12). De hecho, la población en la que, bien por ignorancia o bien por

despreocupación, está afectando más el aumento de las ETS es la de los jóvenes. Los datos de diagnósticos de VIH son elocuentes: en 2004, un 1,8% de los casos tenía entre 13 y 20 años; y la proporción ya era del 10% en 2010 (Plan Nacional sobre el SIDA). Además, en muchos casos se trata de personas que, aunque tienen la información necesaria, no la ponen en práctica cuando tienen relaciones, sobre todo si están bajo los efectos del consumo de drogas, incluyendo el alcohol.

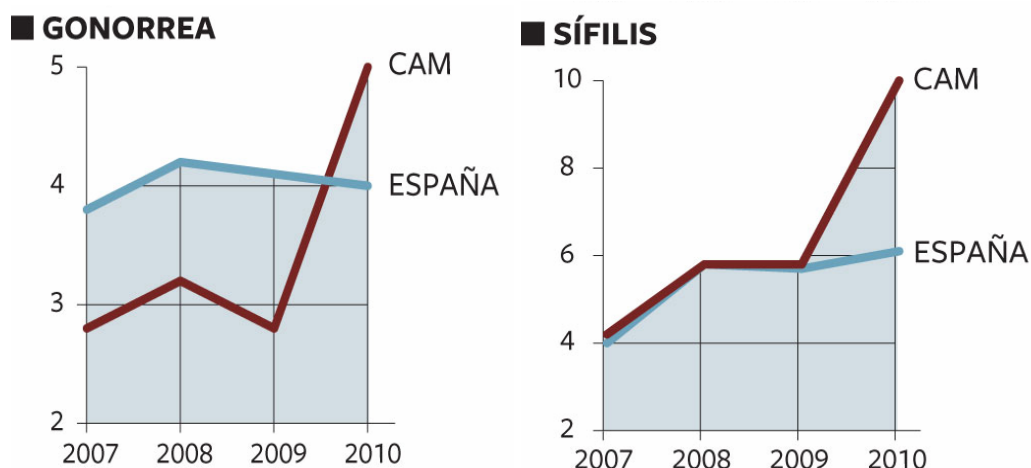


Figura 12. Tasas de gonorrea y sífilis (casos por cada 100.000 habitantes) en la Comunidad de Madrid (CAM) y en España entre los años 2007 y 2010.

El consumo de tabaco o la exposición pasiva al humo generado por fumadores aumenta notablemente el riesgo de retraso en el crecimiento fetal y de PPT (Bloch et al., 2008; Cnattingius, 2004; Honein et al., 2007). Algunos estudios han demostrado que un correcto asesoramiento previo a la concepción, junto con la implicación de las parejas, puede aumentar el número de mujeres que dejan de fumar o evitan la exposición al humo antes del embarazo (Elsinga et al., 2008; Park et al., 2004).

Diversos factores de estrés físico y psicológico, como la depresión, la ansiedad, los problemas socioeconómicos o la violencia de género, determinan un mayor riesgo de PPT (Austin y Leader, 2000; Coker et al., 2004; Hegarty et al., 2004; Sharps et al., 2007; Yonkers et al., 2009), posiblemente mediado por rutas inflamatorias relacionadas con el cortisol (Challis y Smith, 2001; Wadhwa et al., 2001). Cuando dichos factores están presentes antes del embarazo es muy probable que persistan durante el mismo. Por otra parte, las mujeres con factores de estrés psicosocial tienen una mayor probabilidad de sufrir otros comportamientos de riesgo para el PPT, como el tabaquismo o el consumo de alcohol, y son menos propensas a buscar atención sanitaria (Schoenborn y Horm, 1993; Zuckerman et al., 1989). Las intervenciones para

mejorar la salud psicológica de las mujeres antes de la concepción han incluido desde las terapias de grupo hasta el desarrollo de programas de capacitación laboral.

II. 1. 5. 2. Prevención del parto pretérmino durante el embarazo

El embarazo representa un periodo crítico para realizar intervenciones que ayuden a reducir el riesgo de PPT, la mortalidad materno-infantil y otros efectos adversos asociados a un nacimiento antes de tiempo. En este sentido, el riesgo de un PPT es menor en las mujeres que reciben una atención prenatal adecuada (Iams et al., 2008). En general, las intervenciones disponibles están destinadas a tres grupos de población: (1) todas las mujeres embarazadas; (2) las mujeres embarazadas con antecedentes de PPT u otros factores de riesgo, incluyendo gestación múltiple, sangrado durante el embarazo y otros trastornos, como HTA o diabetes; y (3) las mujeres que han iniciado un PPT.

La atención prenatal representa una plataforma de servicios para el seguimiento de las mujeres a lo largo del embarazo con el objetivo de que la salud materna y del neonato sea la mejor posible. Entre los servicios básicos que tienen un impacto potencial en la reducción de las tasas de PPT destacan la identificación de mujeres con embarazo de riesgo, el cribado y el tratamiento de diversas infecciones (VIH, tuberculosis, vaginosis bacteriana, bacteriuria...), el asesoramiento nutricional (incluyendo la identificación y corrección de la malnutrición), una correcta preparación para el parto o las intervenciones de apoyo conductual y social, tales como los programas para dejar de fumar o los destinados a la prevención de la violencia contra las mujeres (Holbrook y Kaltenbach, 2011; OMS, 2003; OMS, 2005a; OMS, 2005c).

Por lo que respecta al estado nutricional de la mujer durante el embarazo, la desnutrición aumenta la vulnerabilidad a la infección y predispone a las embarazadas a sufrir problemas obstétricos, incluyendo un mayor riesgo de PPT (Goldenberg et al., 2008). Los estudios enfocados a la búsqueda de posibles relaciones entre la obesidad y el PPT han proporcionado resultados variables (Requejo et al., 2013). Las investigaciones más recientes sugieren que la asociación entre el índice de masa corporal y el riesgo de PPT puede ser diferente según la raza o grupo étnico, lo que subraya la complejidad del papel que la nutrición puede desempeñar en el desencadenamiento del PPT (Torloni et al., 2012).

Los ensayos clínicos realizados hasta el momento no muestran una relación clara entre la administración de diversos complementos dietéticos (zinc, calcio, magnesio, aceite de pescado, preparados proteínicos o calóricos...) durante el embarazo y la disminución del índice de nacimientos prematuros (Requejo et al., 2013). En este sentido, son necesarios más estudios

para determinar el momento óptimo durante la vida de una mujer en el que las intervenciones nutricionales pueden contribuir a reducir el riesgo de PPT. En cualquier caso, se debe fomentar que las mujeres embarazadas tomen complementos multivitamínicos por otras razones de salud, como la reducción del riesgo de RN de bajo PN o de defectos del tubo neural.

Entre las mujeres embarazadas, se pueden identificar aquéllas con un mayor riesgo de PPT sobre la base de su historia obstétrica (por ejemplo, anomalías uterinas o cervicales conocidas o un PPT previo), su estado a lo largo del embarazo (síndrome hipertensivo, diabetes, embarazo múltiple, sangrado...) o su edad (adolescentes) (Moore, 2002; Tsikouras et al., 2012). Hay varios enfoques para la prestación de atención preventiva para estas mujeres, aunque sería deseable disponer de más herramientas de detección de riesgos basadas en el uso de biomarcadores demográficos y epidemiológicos y de indicadores clínicos (Requejo et al., 2013).

Existe un grupo de muy alto riesgo de PPT espontáneo que incluye a las gestantes asintomáticas con gestación única con antecedente de PPT y cérvix corto en la gestación actual. Para este grupo concreto se han publicado recientemente tres intervenciones eficaces: el empleo de progesterona (Berghella y Society for Maternal-Fetal Medicine Publications Committee, 2012; Romero et al., 2012), la realización de un cerclaje cervical (Alfirevic et al., 2012) o la colocación de un pesario cervical (Goya et al., 2012). El análisis de los tres protocolos de manejo no parece revelar diferencias en la reducción de la tasa de PPT ni en la morbilidad perinatal (Alfirevic et al., 2012); no obstante, se necesitan nuevos estudios prospectivos aleatorizados en los que se comparen directamente las tres estrategias en este grupo de mujeres para poder establecer la mejor herramienta.

II. 1. 5. 3. Tratamiento del parto pretérmino cuando se ha desencadenado

Una vez que el PPT ha comenzado, hay intervenciones que pueden prolongar el embarazo y contribuir a un mejor estado de salud del RN prematuro. Entre ellas, se incluyen, la provisión de agentes tocolíticos (antagonistas de la oxitocina, betamiméticos, bloqueadores de los canales de calcio, sulfato de magnesio) que inhiben las contracciones uterinas y retrasan el parto. La administración de tocolíticos es eficaz para enlentecer el parto, permitiendo el tratamiento con corticosteroides y, en su caso, el traslado de la madre a un centro más adecuado. Cualquier estrategia para prolongar un parto o una cesárea debe contemplar los posibles efectos adversos derivados de una exposición prolongada a condiciones subóptimas, tanto para la madre como para el feto.

La administración de corticosteroides prenatales para embarazadas con alto riesgo de PPT (a partir de las 23 semanas de gestación) puede reducir significativamente el riesgo de muerte, el SDRA y los problemas de desarrollo del RN prematuro. Por otro lado, la ruptura prematura de las membranas está frecuentemente asociada con la infección de las membranas amnióticas, hecho que contribuye al PPT y que puede conducir a problemas neonatales serios, como la parálisis cerebral o la enfermedad pulmonar crónica. En tal circunstancia, el tratamiento con antibióticos puede retrasar el inicio del parto durante un máximo de 48 horas y reducir el riesgo de secuelas en el neonato. Finalmente, la administración de sulfato de magnesio a las mujeres en situación de riesgo de PPT ayuda a proteger el cerebro del niño, reduce las tasas de parálisis cerebral y mejora el estado de salud del niño a largo plazo. No obstante, se necesitan más estudios para evaluar los efectos secundarios que estos tratamientos pueden tener para la madre (enrojecimiento, sudoración, náuseas, vómitos, dolores de cabeza, taquicardia...) y determinar los procedimientos más adecuados para evitarlos o minimizarlos.

II. 1. 6. Manejo del recién nacido prematuro

II. 1. 6. 1. Manejo del prematuro en la sala de partos

El manejo del prematuro en la sala de partos va a depender de su madurez y respuesta a los estímulos y maniobras del personal médico. La rápida actuación y toma de decisiones es de vital importancia por lo que, ante la previsión de un PPT, es necesario disponer de todo el material y medicación que se pueda requerir en los primeros minutos de vida (Iriundo et al., 2008). Los pasos a seguir propuestos por la Asociación Española de Pediatría (AEP) se muestran en la Figura 13.

El color del RN es un buen indicador de su evolución y respuesta adecuada a los tratamientos en la sala de partos. La tonalidad azulada de la piel y mucosas o cianosis es un buen indicio de la escasez de oxígeno en la hemoglobina y el requerimiento de oxigenoterapia. El test de Apgar (examen clínico realizado entre 1 y 5 minutos después del parto) es una prueba sencilla que valora 5 parámetros fisis-anatómicos: tono muscular, esfuerzo respiratorio, frecuencia cardíaca, reflejos y color de la piel. Cada parámetro recibe una valoración de 0 a 2 y da una valoración clínica general del estado del RN. Las valoraciones por encima de 7 indican la buena salud del neonato mientras que por debajo de 3 requieren atención de emergencia (Apgar, 1953).

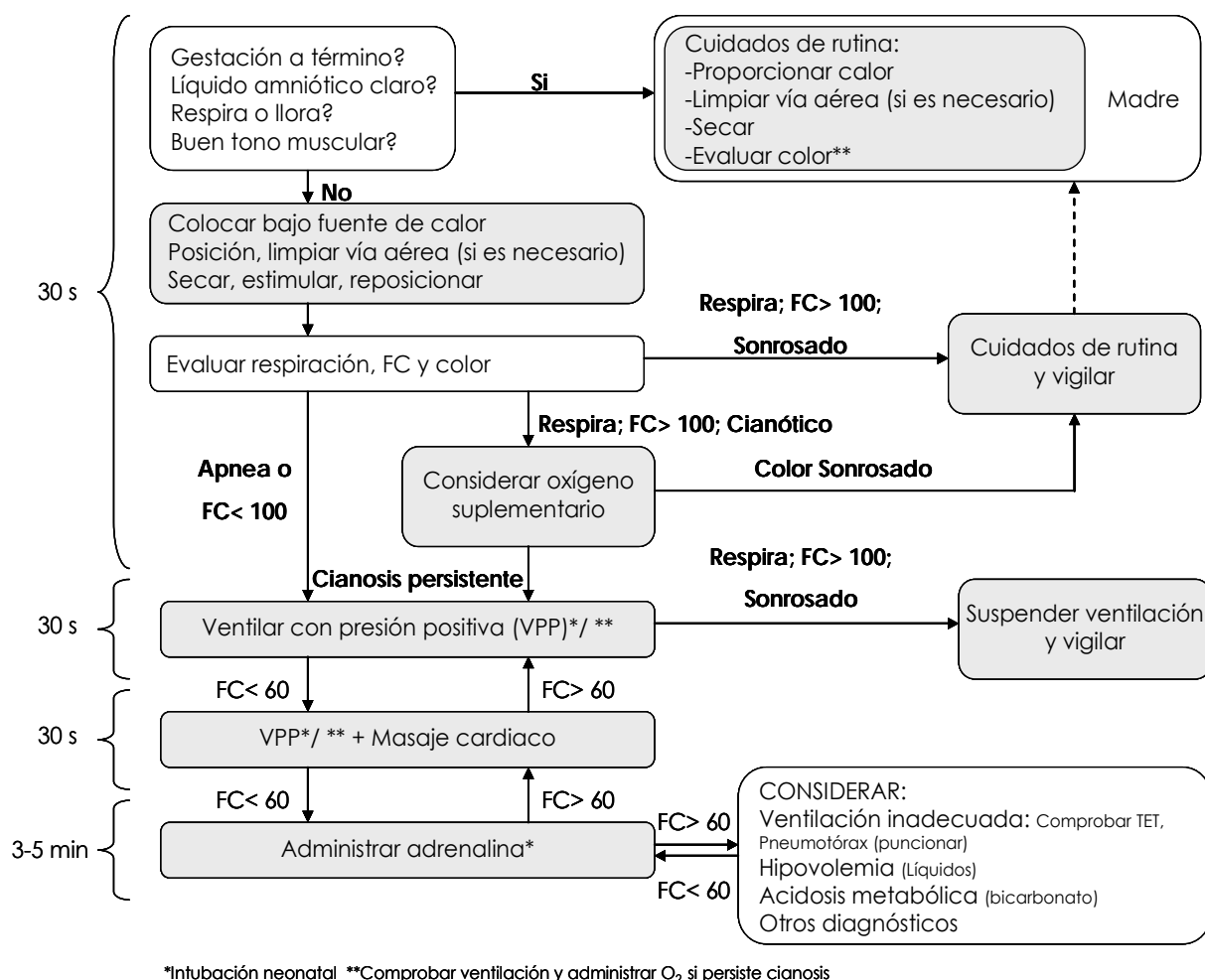


Figura 13. Algoritmo de reanimación neonatal completa en sala de partos. FC: frecuencia cardíaca en latidos por minuto; TET: Tubo endotraqueal. Fuente: Iriondo (2008).

En función del estado del prematuro y los recursos de la sala de partos la separación de la madre puede retrasarse, pero debe potenciarse el contacto piel con piel siempre y cuando el RN sea capaz de mantener la temperatura y no presente SDRA (Whyte, 2012).

Una vez el RN se ha estabilizado es ingresado en la UCIN donde pasará las primeras semanas e incluso meses de vida. Debido al menor desarrollo intraútero, el prematuro necesita cuidados especiales durante su estancia hospitalaria. Sus requerimientos fisiológicos son complejos y puede sufrir diferentes complicaciones. Tanto el macroambiente (ruido, actividad, ajustes de luz, estimulación táctil, calidad/duración del sueño) como el microambiente (terapia individualizada) de estas unidades está muy controlado, con la finalidad de reducir al máximo el estrés generado al RN y a sus familias (Ludington-Hoe, 2013; Scher et al., 2009). Lo más habitual es que a su ingreso en la UCIN el prematuro extremo precise de incubadora (termoneutralidad, 36,7-37,3°C) y monitorización cardiorrespiratoria.

El manejo del prematuro debe ser cuidadoso y el uso de antisépticos en los accesos vasculares y cicatrización umbilical moderado. El baño se realiza con gases estériles suaves y agua destilada templada. Durante las dos primeras semanas no se aconsejan baños diarios ni el uso de jabón. Se emplean cremas hidratantes para evitar sequedad, descamación y fisuras en la piel. Los apósitos deben ser del menor tamaño posible, se emplean en zonas de roce o presión y deben humedecerse antes de retirarse. Los cambios frecuentes de postura reducen las rozaduras. Durante los procedimientos e intervenciones es importante controlar la limpieza y temperatura de las manos del personal. Se realizan caricias cíclicas suaves facilitando la transición gradual del sueño a la vigilia y viceversa. Los niños se mantienen arropados y con gorros para prevenir la pérdida excesiva de calor. El escaso desarrollo de la epidermis hace que las pérdidas de agua por evaporación estén aumentadas, por lo que es otro factor a controlar en la incubadora. Los primeros días de vida se mantendrá la humedad por encima del 75% y se irá bajando progresivamente. Las intervenciones en la postura pueden provocar un estado de calma y estabilidad psicológica en el prematuro de alto riesgo. La más adecuada es la posición prono, porque facilita la flexión, disminuye el área corporal y facilita el control de la cabeza, así como la oxigenación. Se ha comprobado que la incubadora es un generador de estrés en el neonato, debiéndose favorecer el contacto parental (Ludington-Hoe, 2013).

II. 1. 7. Manejo de los niños prematuros: alimentación

La población de neonatos prematuros es muy heterogénea y, en consecuencia, las necesidades nutricionales pueden variar notablemente. Las recomendaciones que se dan a continuación van dirigidas a la nutrición de los RN de muy bajo peso (<1500 g) y los de extremadamente bajo peso (<1000 g), que habitualmente tienen menos de 32 semanas de EG. Estos prematuros son los que presentan más problemas durante su estancia hospitalaria y desarrollan más complicaciones a largo plazo por los aportes nutricionales deficitarios durante los primeros momentos.

Cuando un RN nace prematuramente, el aporte de nutrientes que sustenta su crecimiento durante su vida intrauterina se ve bruscamente interrumpido. Actualmente se acepta que este aporte se debe restaurar lo antes posible para conseguir un crecimiento lo más próximo al crecimiento fetal durante el período hospitalario y optimizar su crecimiento y niveles de neurodesarrollo a largo plazo (Ziegler, 2011). Aunque existen métodos para estimar el gasto calórico y las necesidades energéticas del RN y de esta forma poder estimar sus necesidades nutricionales, en la práctica clínica los parámetros nutricionales de peso, longitud y perímetro cefálico continúan siendo los de elección en la programación de su nutrición durante la estancia hospitalaria (Hall, 2001).

Diversas intervenciones nutricionales tempranas (nutrición parenteral precoz, nutrición enteral trófica, fortificación) tienen el objetivo de evitar la subnutrición y disminuir el número de pacientes con peso, longitud y perímetro cefálico por debajo de los valores esperados para su edad corregida. Estas medidas, aunque tienen una amplia variabilidad interpersonal e intercentros (Klingenberg et al., 2012), deben contar con un soporte nutricional adecuado durante todo el periodo de crecimiento compensatorio, dado que el primer año de vida es clave para la recuperación nutricional; además los requerimientos son mayores en los RN con déficits nutricionales previos.

Después de nacer, los niños prematuros pueden ganar 15-20 g/kg/día, valores similares a los del feto *in utero*. Este aumento de peso es difícil de conseguir durante las primeras semanas de vida y, por lo general, no se consigue hasta 1 o 2 semanas después del nacimiento (Embleton et al., 2001; Fanaro, 2010). Esto contribuye a que, aunque la mayoría de los prematuros al nacer tienen un peso acorde con su EG, al abandonar el hospital suelen tener un peso inferior al percentil 10 para su edad. Esta subnutrición puede ser consecuencia tanto de un aporte nutricional insuficiente como de complicaciones que incrementen los requerimientos nutricionales y que a la larga pueden ocasionar problemas neurológicos y metabólicos (Ehrenkranz, 2010; Sakurai et al., 2008). En este sentido, un RN con un peso inferior a 1 kg contiene tan sólo un 1% de grasas y un 8% de proteínas con una reserva calórica no proteica de 110 kcal/kg, lo que es escasamente suficiente para mantener las necesidades basales durante los primeros 4 días de vida. Si a esto se añade una insuficiencia respiratoria o una sepsis, el consumo metabólico es mucho mayor y estas reservas se agotan mucho antes (Monasterolo et al., 2013). Por ello, el manejo nutricional del RN prematuro afecta a su morbilidad a corto, medio y largo plazo (Gianni et al., 2012; Klingenberg et al., 2012).

Para minimizar la falta de nutrientes que ocurre tras el parto y reducir la interrupción del crecimiento y desarrollo que ocurre tras el PPT, se han propuesto estrategias de nutrición precoz que pretenden evitar el estado catabólico que acontece en los primeros días de vida. La ausencia de alimento en el TGI produce atrofia de la mucosa y vellosidades y reduce la cantidad de enzimas necesarias para la digestión y absorción de sustratos; por lo tanto, no es de extrañar que la nutrición enteral mínima estimule el desarrollo gastrointestinal y mejore la tolerancia alimentaria (Mosqueda et al., 2008).

Cada vez existe menos controversia sobre cuando debe iniciarse la nutrición enteral precoz en los RN con PN inferior a 1500 g. La nutrición enteral mínima es un término que refleja el intento de facilitar la maduración estructural, funcional y microbiana de un intestino inmaduro mediante la administración de pequeñas cantidades de leche, independientemente de la nutrición parenteral suministrada de forma rutinaria (Cilieborg et al., 2012). Diversos autores recomiendan el inicio de la nutrición enteral precoz con volúmenes que oscilan entre los 4-12 ml/kg/día de leche cada 2 horas por

sonda intragástrica mientras se reduce la nutrición parenteral (Tudehope, 2013). Se ha observado que los prematuros que reciben nutrición enteral mínima desarrollan un tránsito intestinal más rápido y patrones de motilidad intestinal normales en menor tiempo, lo que se traduce en mejor tolerancia digestiva y un menor tiempo para alcanzar la nutrición enteral completa (Edmond y Bahl, 2008; Mosqueda et al., 2008).

II. 1. 7. 1. Lactancia materna

La leche materna es el alimento ideal durante los primeros meses de vida. Su composición, extremadamente compleja, es distinta en cada especie de mamífero y, dentro de una especie, varía dependiendo del individuo (base genética, estado de salud, dieta, lugar de residencia...), la EG, el periodo de lactancia, el ritmo circadiano, la fracción de la toma y otros muchos factores (Ballard y Morrow, 2013). Actualmente existe evidencia sólida que demuestra que la leche materna (fortificada cuando sea necesario) es la mejor opción para los niños de cualquier EG, incluyendo los prematuros, en quienes sus beneficios antiinfecciosos, inmunológicos, neurológicos, emocionales y económicos adquieren especial relevancia (Agostoni et al., 2009; Eidelman, 2012; Lee da et al., 2012; Schanler, 2011; Schanler, 2007; Wight et al., 2008).

Los beneficios de la leche materna para los niños prematuros incluyen un vaciado gástrico más rápido (Ewer y Yu, 1996; Schanler et al., 1999), una tolerancia más rápida a la alimentación enteral y una reducción de la necesidad de nutrición parenteral (Schanler, 2000), una mejora en la absorción de nutrientes (Hamosh, 1994), un mejor desarrollo visual y cognitivo (DiBiasie, 2006; Hart et al., 2003; Sacker et al., 2006; Schanler et al., 2005), la reducción de la incidencia de NEC, retinopatía del prematuro, sepsis y otras infecciones (Chauhan et al., 2008; Lucas y Cole, 1990; Ronnestad et al., 2005; Sisk et al., 2007; Manzoni et al., 2013) y tratamientos con oxigenoterapia y tiempos de hospitalización más cortos (Blaymore et al., 2002; Vohr et al., 2007; Ahrabi et al., 2013; Johnson et al., 2013).

Probablemente, estos efectos sean debidos a la acción combinada de los nutrientes y una variedad de factores bioactivos presentes en el calostro y la leche materna, tales como inmunoglobulinas (Ig), células inmunocompetentes, ácidos grasos antimicrobianos, poliaminas, oligosacáridos, lisozima, lactoferrina y otras glicoproteínas, péptidos antimicrobianos y bacterias comensales y potencialmente probióticas (Ballard y Morrow, 2013; Fernandez et al., 2013) (Tabla 2).

Tabla 2. Actividad biológica de los principales componentes de la leche humana.

Proteínas y péptidos	Caseínas α y β	Transporte de minerales (Ca, Fe, Zn, Cu) Precursores de péptidos bioactivos
	Glicomacropéptido	Actividad antiviral Factor bifidogénico Precursor de péptidos bioactivos
	Proteínas del suero: Lactoferrina Lisozima Inmunoglobulinas (sIgA, IgG, IgM) α -Lactalbúmina Otras enzimas: glutathion peroxidasa, catalasa, superóxido dismutasa	Absorción de hierro Actividad antimicrobiana y antioxidante Inmunomodulación Actividad anticarcinogénica Actividad antimicrobiana (efecto sinérgico con Igs y lactoferrina) Protección inmunológica Síntesis de lactosa en glándula mamaria Transporte de calcio Actividad anticarcinogénica en asociación con el ácido oleico Actividad antioxidante
Lípidos	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga: ácidos araquidónico y docosahexanoico	Desarrollo neurológico, cognitivo y de la función visual
	Ácidos grasos de cadena corta	Actividad antimicrobiana Actividad anticarcinogénica Protección del epitelio intestinal
	Ácido linoleico conjugado	Actividad anticarcinogénica Factor de crecimiento
Glúcidos	Lactosa Oligosacáridos Mucinas	Prebiótico Inmunomodulación Ligandos para microorganismos
Otros	Poliaminas	Maduración y desarrollo del epitelio intestinal Inmunomodulación
	Nucleótidos y nucleósidos	Inmunomodulación Desarrollo y funcionamiento del epitelio intestinal Metabolismo lipídico
	Hormonas y factores de crecimiento	Regulación de distintas funciones
	Microbiota comensal (probióticos)	Colonización del intestino Protección frente a infecciones Desarrollo del sistema inmunitario Desarrollo cognitivo
	Células del sistema inmunitario	Protección inmunológica
	Membrana del glóbulo graso	Inhibición de infección por virus

Adaptado de Donovan (2006) y Hamosh (2001).

La EG también puede influir en la concentración de nutrientes y compuestos bioactivos, de tal manera que, en general, la leche de las madres de prematuros está particularmente adaptada para satisfacer las necesidades específicas de esa población (Dvorak et al., 2003; Koenig et al., 2005; Moltó-Puigmartí et al., 2011; Montagne et al., 1999; Schanler et al., 2005; Zhang et al., 2013). En este sentido, la leche de madres de prematuros suele tener una mayor cantidad de proteínas (aumento del 15-20%) y lípidos (aumento del 20-30%) y un menor contenido en lactosa en comparación con la leche de madres de niños nacidos a término. El contenido proteico y graso es mayor en el calostro que en la leche de transición y en la madura, respectivamente, aunque este cambio es mucho más lento en el caso de la leche de madres de prematuros. En cuanto a los micronutrientes, la leche de estas madres presenta un mayor contenido en minerales (Bauer y Gerstl, 2011; Geddes et al., 2013; Narang et al., 2006) (Tabla 3). Las proteínas cuya concentración está más aumentada en la leche de madres de RN prematuros son la lipasa, la lactoferrina y la lactoalbúmina, así como diversos péptidos libres, todos ellos relacionados con la mejora digestiva y la inmunidad innata (Molinari et al., 2012; Tudehope, 2013; Wan et al., 2013). La composición lipídica también varía, observándose mayor cantidad de ácidos grasos de cadena media y de ciertos ácidos grasos poliinsaturados, como el docosahexanoico y el araquidónico, ambos de gran importancia en el desarrollo visual y cerebral de estos niños (Geddes et al., 2013).

Recientemente se ha observado que el calostro de madres de RN muy prematuros poseía una concentración más elevada de diversos compuestos inmunológicos, incluyendo IgA, interleuquina (IL)-6, el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α , del inglés, *Tumor Necrosis Factor α*), IL-4, IL-17, la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1, del inglés, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*), la proteína inflamatoria de macrófagos-1 β (MIP-1 β , del inglés, *Macrophage Inflammatory Protein 1 β*), IL-5, IL-7 o el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, del inglés, *Granulocyte Colony Stimulating Factor*), que la observada en muestras de calostro de mujeres con embarazos a término (Espinosa-Martos et al., 2013).

Previamente ya se había descrito que la inmunoprotección proporcionada por el calostro y la leche (aún siendo notable) disminuye a medida que aumenta la EG (Castellote et al., 2011; Koenig et al., 2005; Montagne et al., 1999). El proceso de maduración de la glándula mamaria parece ser paralelo al del feto, primero, y al del lactante, después; de hecho, el cierre de las zonas de oclusión del epitelio mamario se retrasa tras un nacimiento prematuro. Esto sugiere que el calostro y la leche pueden ser especialmente protectores para los niños muy prematuros, una población con mayor riesgo de intolerancia alimentaria e infecciones (Thompson y Bizzarro 2008; Westerbeek et al., 2006). En consecuencia, sería muy conveniente iniciar la alimentación enteral de los RN prematuros utilizando el calostro de la propia

madre ya que es un procedimiento sencillo, barato y bien tolerado incluso por los RN más prematuros y más enfermos (Rodríguez et al., 2010).

Tabla 3. Composición de la leche de transición y madura de las madres de recién nacidos prematuros en comparación con la leche madura de las madres de los nacidos a término^a.

	Leche de transición RN prematuro (6 – 10 días)	Leche madura RN prematuro (30 días)	Leche madura RN a término (>30 días)
Macronutrientes			
Energía (Kcal/l)	660 ± 60	690 ± 50	640 ± 80
Proteínas (g/l)	19 ± 0,5	15 ± 1	12 ± 1,5
Grasas (g/l)	34 ± 6	36 ± 7	34 ± 4
Carbohidratos (g/l)	63 ± 5	67 ± 4	67 ± 5
Minerales			
Calcio (mmol/l)	8 ± 18	7,2 ± 1,3	6,5 ± 1,5
Fósforo (mmol/l)	4,9 ± 1,4	3 ± 0,8	4,8 ± 0,8
Magnesio (mmol/l)	1,1 ± 0,2	1 ± 0,3	1,3 ± 0,3
Sodio (mmol/l)	11,6 ± 6	8,8 ± 2	9 ± 4,0
Potasio (mmol/l)	13,5 ± 2,2	12,5 ± 3,2	13,9 ± 2,0
Cloro (mmol/l)	21,3 ± 3,5	14,8 ± 2,1	12,8 ± 1,5
Hierro (mg/l)	0,4	0,4	0,4
Zinc (µmol/l)	58 ± 13	33 ± 14	15 ± 46
Vitaminas			
A (UI/l)	500 – 4000	500 – 4000	600 – 2000
E (mg/l)	2,9 – 14,5	2,9 – 14,5	2 – 3
K (µg/l)	0,7 – 5,3	0,7 – 5,3	1,2 – 9,2
D (UI/l)	40	40	40
Folato (mg/l)	33	33	1,8

^aValores de algunos nutrientes expresados en medias ± desviación estándar o en valores extremos. Fuente: Bustos (2008).

El caso del *mio*-inositol es otro buen ejemplo de la adaptación de la leche materna a la EG del neonato. En contraste con la lactosa o la glucosa, la concentración de este carbohidrato disminuye significativamente durante los primeros 4 días de lactancia (Espinosa-Martos et al., 2013; Jóźwik et al., 2013; Pereira et al., 1990; van Beusekom et al., 1993). El inositol promueve la maduración de varios componentes del surfactante y puede desempeñar un papel crítico en la vida fetal y neonatal (Howlett et al., 2012). En un estudio pionero, Bromberger y Hallman (1986) encontraron grandes diferencias en la concentración de inositol de diversas fuentes de alimentación infantil (calostro de madre de niño prematuro, calostro de madre de niño nacido a término; leche madura, fórmulas infantiles, nutrición parenteral). De todas ellas, el calostro de madres de niños prematuros tenía la mayor concentración de

inositol y era significativamente mayor que la existente en el calostro de madres que dieron a luz a término (Bromberger y Hallman, 1986). Los resultados de dos trabajos recientes confirman estos hallazgos (300,59 y 243,28 mg/l en calostro de madre de prematuro y de madre de niño a término, respectivamente) (Espinosa-Martos et al., 2013).

La administración de inositol a niños prematuros con SDRA que reciben nutrición parenteral durante la primera semana de vida se asocia con un aumento de la supervivencia sin DBP y con una disminución de la incidencia de la retinopatía del prematuro (Bromberger y Hallman, 1986; Hallman et al., 1992). Recientemente, en una revisión Cochrane llegó a la conclusión de que la complementación de la dieta de prematuros con *mio*-inositol conduce a reducciones estadísticamente significativas y clínicamente relevantes en la tasa de diversas complicaciones habituales en estos niños (Howlett et al., 2012).

Por otra parte, el porcentaje de mujeres con una microbiota detectable en leche es significativamente menor entre las madres de niños prematuros que entre las de nacidos a término. Este hecho puede deberse a dos razones. En primer lugar, se ha señalado que la microbiota mamaria se forma en las últimas semanas del embarazo a través de una ruta entero-mamaria que implica complejas interacciones entre bacterias y monocitos en el intestino de la gestante (Jeurink et al., 2013; Perez et al., 2007). Por lo tanto, el proceso de colonización de las glándulas mamarias no se ha completado, cuando menos, en las madres de prematuros extremos. En segundo lugar, el porcentaje de madres de prematuros que reciben antibioterapia es muy elevado y, muy recientemente se ha observado que la detección de lactobacilos o bifidobacterias es significativamente menor en muestras de leche de mujeres que habían recibido antibioterapia durante el embarazo o la lactancia (Soto et al., 2014). Es bien sabido que los antibióticos son responsables de disbiosis en la microbiota humana y cada vez es más evidente que la antibioterapia durante el embarazo, el parto y la lactancia altera la microbiota materna (Murk et al., 2011). Este déficit de microorganismos viables en la leche de madres de niños prematuros se podría compensar mediante la administración de probióticos al niño o mediante la creación de una microbiota mínima representativa de la leche humana con la que se suplementara la leche materna donada (LMD) tras su pasterización (aspecto que se tratará posteriormente).

En el caso de madres de niños prematuros, el establecimiento de la lactancia suele complicarse, especialmente cuando la EG es muy corta. En tales casos, la producción de leche puede ser insuficiente debido al desarrollo incompleto de la mama al tiempo de acabar la gestación. Por otra parte, cuando el prematuro está preparado para iniciar la alimentación oral, el hábito a la extracción con bomba puede dificultar la eyección de leche ante la débil succión del RN. Entre las estrategias para facilitar el establecimiento de

la lactancia está la succión no nutritiva (con el pecho vacío) ya que facilita la maduración de la coordinación succión- deglución-respiración. Se desconoce cual es el mejor momento para iniciar la alimentación oral en el prematuro, pero suele hacerse cuando se detecta patrón de succión, habitualmente entre las semanas 33 y 34 (Abrams et al., 2011). Las dificultades en el establecimiento de la lactancia se asocian con una menor duración de la lactancia en este grupo de madres; las mayores tasas de abandono de la lactancia tienen lugar tras 2-6 semanas del alta hospitalaria (Abrams et al., 2011; Blaymore et al., 2002; Perrella et al., 2012).

Entre las medidas para la promoción y el soporte de la lactancia materna en madres de niños prematuros, destacan las siguientes (Bustos, 2008):

(a) *Participación de los padres en los cuidados*. La participación continua de los padres en los cuidados en la UCIN mejora la tasa de lactancia materna y acorta la estancia hospitalaria.

(b) *Método de la madre canguro*. Se puede definir como el contacto piel con piel entre madre y RN prematuro lo más precoz, continuo y prolongado posible con lactancia materna, para que madre y RN se beneficien de sus ventajas. Se trata de un sistema aconsejable para prematuros de cualquier EG, de cualquier peso y con cualquier tipo de enfermedad, mientras sea tolerado por el binomio madre-hijo y por la UCIN (Cattaneo et al., 1998; Ludington-Hoe y Swinth, 1996; Papí et al., 2007). Entre las ventajas de este método se incluyen las siguientes: facilita la lactancia materna y un apego más rápido, mejora la temperatura del RN y disminuye tanto el estrés en el neonato y la madre como las infecciones y la morbilidad en los RN prematuros. Sin embargo, solo el 40,9% de los centros hospitalarios que cuentan con UCIN en España han implementado el método madre canguro, según el último informe publicado en 2012 por la *European Science Foundation Network* sobre "*Participación de los Padres y Método Canguro en UCI neonatales europeas*". Una cifra muy alejada del 100% que registran Gran Bretaña, Suecia, Dinamarca o Países Bajos e, incluso, países como Francia, con un 73% de aplicación, o Italia, que ya ha alcanzado un 80% de implantación en sus servicios de UCIN.

(c) *Succión no nutritiva*. La succión del pecho vacío, tras la extracción de leche, puede favorecer la lactancia materna al alta. La succión de tetina es placentera en los RN prematuros de menos de 32 semanas, no interfiere con la lactancia posterior y acorta la estancia hospitalaria, pero no mejora el crecimiento.

(d) *Consejos sobre lactancia y apoyo continuado en el hospital y en el domicilio*. No hay estudios de eficacia del consejo a madres de RN prematuros de menos de 32 semanas, pero sí a las de pretérminos de más de 32 semanas y nacidos a término, donde está bien contrastada.

(e) *Alta precoz*. En España y en otros países una amplia experiencia con los programas de alta precoz con apoyo en domicilio. Suelen incluir a RN prematuros estables y con menos de 2000-2200 g capaces de alimentarse por vía oral. Estos programas son seguros y muy satisfactorios para los padres y los niños. También se favorece el mantenimiento de la lactancia y se acorta la estancia hospitalaria.

Incluso cuando la lactancia se establece sin problemas, a veces es necesario que la mujer se extraiga la leche y la conserve adecuadamente hasta su administración ante la imposibilidad de amamantar directamente a su hijo. La extracción generalmente se lleva a cabo mediante el uso de bombas mecánicas. Estos aparatos constan de varias piezas y su diseño no permite, en la actualidad, que el tratamiento de esterilización sea efectivo, por lo que es frecuente que la leche se altere microbiológicamente. Entre los grupos bacterianos asociados al uso de las bombas extractoras destacan diversos representantes de la familia *Enterobacteriaceae* y algunas otras bacterias Gram-negativas (Drazin, 1998; Landers y Updegrave, 2010; Law et al., 1989; Ng et al., 2004; Ng et al., 1995; Olver et al., 2000). La grasa es el nutriente más afectado por los tratamientos de conservación ya que la refrigeración afecta a la solubilización de los lípidos polares, observándose pérdidas de hasta el 15%; por su parte, la congelación conlleva la formación de cristales de hielo que rompe de los glóbulos grasos (López, 2011). Las proteínas funcionales (α -lactoalbúmina, lactoferrina) se mantienen adecuadamente en refrigeración durante un periodo máximo de 48 h, mientras que la concentración de otras proteínas, como la lipasa o las caseínas, sufre una rápida reducción tras apenas 4 h en las mismas condiciones. Los componentes celulares y las Igs también pueden disminuir considerablemente si la conservación de la leche no es la adecuada (Ballard y Morrow, 2013; Molinari et al., 2011; Williamson y Murti, 1996). La congelación afecta a la concentración de la proteína de unión a ácidos grasos (FABP, del inglés *Fatty Acid Binding Protein*) y de ciertos componentes protectores como la lisozima (reducciones de hasta el 40%), lactoferrina (11%) e IgA (8%) (Molinari et al., 2011; Chang et al., 2013).

II. 1. 7. 2. Leche materna donada

La LMD por otras madres se convierte en la mejor alternativa si, por cualquier motivo, no se dispone de leche de la propia madre (American Academy of Pediatrics, 2012; Arslanoglu et al., 2013). A corto plazo, los RN alimentados con LMD presentan una menor incidencia de NEC e infecciones nosocomiales y una mejor tolerancia digestiva que los alimentados con fórmulas artificiales (Boyd et al., 2007; Narayanan et al., 1984; Quigley et al., 2007). A largo plazo, presentan un mejor neurodesarrollo y un menor riesgo cardiovascular (Singhal et al., 2001; Singhal et al., 2004). Desde un punto de

vista económico, el uso de LMD supone un importante ahorro del gasto sanitario (Arnold, 2002). Así, por ejemplo, por cada euro invertido en LMD la UCIN ahorra entre 6 y 19 euros sólo en costes directos. Se ha observado que la apertura de un banco de leche no disminuye la tasa de lactancia materna y sí disminuye significativamente la exposición a fórmulas artificiales en las primeras 4 semanas de vida (Utrera Torres et al., 2010). Dados los problemas conocidos asociados al uso de fórmulas artificiales en RN de riesgo alto, sería éticamente cuestionable su empleo en un grupo control en aquellas UCIN que dispongan de LMD. Por ello, parece que es el momento de aceptar los beneficios probados y potenciales de la LMD y el fomento de su uso para que se convierta en el estándar de alimentación de aquellos neonatos de riesgo alto que no disponen de la leche de su propia madre (García-Lara et al., 2012).

Dado que gran parte de las muestras biológicas analizadas en esta Tesis Doctoral se obtuvieron en el Servicio de Neonatología del Hospital 12 de Octubre de Madrid, a continuación se describirá su Banco de Leche, que fue el primero que se abrió en España con gestión pública. En el año 2000 surgió en dicho Servicio la iniciativa de abrir un banco de leche. Durante los años 2000 y 2004 se realizaron visitas a distintos bancos de leche del mundo, se revisó la bibliografía publicada al respecto y se analizaron los distintos modelos de banco existentes. Se elaboró un proyecto que se presentó a la Dirección del Hospital, a la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) y al Ministerio de Sanidad con la finalidad de conseguir la financiación necesaria para ponerlo en marcha. En el año 2006, el Ministerio de Sanidad incluyó la donación de leche materna dentro de las líneas financiadas a través de los fondos de cohesión para la mejora de la atención perinatal. La Consejería de Sanidad de la CAM valoró positivamente el proyecto del banco de leche materna y se adjudicaron los fondos suficientes a través de un programa del Ministerio de Sanidad para poner en marcha la iniciativa.

En diciembre de 2007 se abrieron las puertas del Banco de Leche Humana del Hospital 12 de Octubre (BLHDO). Los objetivos principales con los que se abrió fueron recoger, almacenar, pasteurizar, controlar y dispensar LMD para niños enfermos bajo prescripción médica con garantía de calidad y seguridad; promocionar la lactancia materna y fomentar su donación para los niños enfermos; evaluar y difundir la experiencia mediante la elaboración de guías y documentos propios, la recogida sistemática de datos y el apoyo a otros bancos de leche en España; desarrollar proyectos de investigación; y, abastecer de leche a otros servicios de la CAM (Vázquez Román et al., 2009).

La donación de leche para el BLHDO es voluntaria y altruista. La donación se puede iniciar en cualquier momento de la lactancia, pero se recomienda esperar entre 3 y 8 semanas desde el parto para que la lactancia esté correctamente establecida. No hay límite superior en los meses que una mujer puede estar donando. A todas las posibles donantes se les realiza una entrevista personal acerca de hábitos de vida y estado de salud, y extraen

muestras para el análisis serológico de VIH, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C y sífilis. Se les da normas de extracción y conservación de la leche tanto de forma oral como escrita y comunica la importancia del adecuado control de la cadena de frío. Firman un consentimiento y se les informa acerca del destino final de su leche y de que pequeñas cantidades podrían dedicarse a la investigación, si así lo consienten. Se les suministra un sacaleches, si no tienen uno propio, recipientes de cristal estériles, etiquetas para identificar los botes y una nevera portátil para el transporte de la leche. La extracción de leche se puede realizar en el domicilio, conservándola congelada y transportándola al BLHDO como máximo cada 15 días, siempre y cuando dispongan de congeladores adecuados.

Cuando se recibe la leche, se comprueba que los recipientes sean adecuados, que estén en buenas condiciones y correctamente etiquetados y que la leche esté bien congelada. Una vez registrados, se almacenan en congeladores a -20°C . La leche que se va a pasteurizar se descongela en un baño de agua María (40°C), bajo vigilancia estricta. La descongelación se detiene en el momento en que queda un bloque central de hielo que sea aproximadamente el 50% del total de la leche. No se mezcla la leche de distintas donantes. Una vez descongelada, lo primero que se hace es olerla, ya que el olor anómalo o el *off-flavor*, es un reflejo de las alteraciones en la composición debidas al almacenamiento. Se rechazan aquellas leches con olor a pescado o a rancio. Posteriormente se analiza la acidez Dornic, que se correlaciona de forma positiva con el grado de contaminación bacteriana de la leche (a mayor acidez, mayor contaminación), y el crematocrito, que es la proporción de crema (grasa y parte de las proteínas); a partir del crematocrito se hace un cálculo de las calorías. La leche queda, por tanto, clasificada en función de dos características: la acidez y las calorías, y así se puede adecuar la leche a cada receptor en función de sus necesidades. La leche se desecha cuando presenta una acidez igual o superior a 8° Dornic.

La leche de cada una de las donantes se divide en alícuotas de 30, 60 o 120 ml. A continuación se pasteuriza por el método Holder (a $62,5^{\circ}\text{C}$ durante 30 min) y el enfriamiento posterior debe ser lo más rápido posible para evitar el cambio indeseable de propiedades. Durante todo el procedimiento la temperatura de la leche se monitoriza y registra en un recipiente testigo. Una vez finalizado, se toma una muestra de la leche para su cultivo microbiológico y se vuelve a congelar a -20°C hasta el momento de su dispensación. El tiempo máximo de almacenamiento postpasteurización es de 3 meses.

Los receptores habituales de LMD son los niños prematuros menores de 32 semanas de gestación o menores de 1.500 g, cuyas madres no pueden proporcionar suficiente leche por diferentes razones. Otros receptores son niños con enfermedad quirúrgica abdominal, cardiopatías con bajo gasto cardíaco y otras enfermedades con riesgo de NEC. La administración se hace siempre bajo prescripción médica.

Los bancos de leche humana deben controlar la seguridad de la LMD y tratar de preservar al máximo posible sus propiedades nutricionales y biológicas. Por ello, el BLHDO tiene implantado el sistema de análisis de peligros y puntos de control críticos (APPCC) utilizado en la industria alimentaria; además, en junio de 2010, obtuvo la certificación de su sistema de gestión de calidad según la norma UNE-EN ISO 9001. Este sistema abarca todos los procesos llevados a cabo en el banco de leche desde la promoción de la donación hasta la distribución interna a los receptores (neonatos ingresados). Además, se sigue un sistema de trazabilidad de las muestras de LM tan riguroso como el empleado para la donación y la recepción de sangre. La implantación del sistema de gestión de calidad permite un control riguroso y una mejora continua de todos los procesos implicados. La satisfacción de las madres donantes y de los profesionales sanitarios que usan y prescriben la LMD es también un punto clave de este sistema de gestión de calidad. Entre las mejoras obtenidas tras la implantación podría citarse la importante disminución de las pérdidas de leche cruda al conseguir optimizar la eficiencia de la pasteurización.

Las asociaciones internacionales de bancos de leche fomentan y apoyan la investigación en leche humana y bancos de leche. Hasta el momento, se desconocen muchos aspectos en relación con la LMD, los posibles contaminantes que puede contener y la repercusión que tiene el almacenamiento en congelación y el procesamiento térmico en los macronutrientes, los micronutrientes y el amplio abanico de compuestos biológicamente activos que contiene la leche humana. Así, por ejemplo, la relación al consumo de tóxicos y medicamentos por parte de la donante solo se realiza una encuesta de salud, por lo que resulta fundamental una validación de los cuestionarios sus hábitos de salud (Escuder-Vieco et al., 2013). Por otro lado, aunque algunos nutrientes y compuestos bioactivos presentes en la leche humana fresca permanecen activos después de dicho tratamiento térmico, la actividad biológica de otros se ve afectada en mayor o menor medida (Fidler et al., 1998; Gómez de Segura et al., 2012; Koenig et al., 2005; Tully et al., 2001) (Tabla 4). Además, la leche materna es una fuente de bacterias comensales y potencialmente probióticas, que parecen desempeñar un papel importante en la colonización inicial del intestino humano (Fernández et al., 2013) y que resultan destruidas por la pasteurización.

Conocer bien las limitaciones de la LMD sería de mucha utilidad para tratar de complementarla y/o establecer fechas de caducidad más adecuadas. Actualmente, los bancos no tienen criterios comunes en algunos de los procedimientos utilizados y tampoco en los tiempos de caducidad. Conocer mejor la repercusión que todo ello tiene en la calidad y la seguridad de la leche podría ayudar a unificar criterios. Además, se están intentando encontrar otros tratamientos para evitar la destrucción o desnaturalización de

ciertos componentes bioactivos de la LMD que conlleva la pasteurización por calor. Por todo ello, la investigación es fundamental en los bancos de leche.

Tabla 4. Impacto de la pasteurización sobre algunos componentes de la leche humana.

Componente	Efecto de la pasteurización
Proteína	Escasa reducción (0.3 g/100 ml)
Amilasa	Pérdida del 15% de su actividad
Lipasa	Destrucción
Lactoferrina	Reducción significativa
Lisozima	Pequeña reducción
Grasa	Escasa reducción, más afectada por trasvasados
Ácido linoleico	Mínimo
Ácido linolénico	Mínimo
Monoglicéridos	Mínimo
LCPUFA ^a	Mínimo
Hidratos de carbono	Mínimo
Lactosa	Mínimo
Oligosacáridos	No afectados
Micronutrientes	Muy variable
Minerales	Mínimo
Vitaminas	Reducciones importantes de vitaminas C, A y folatos
Leucocitos	Reducción significativa
Linfocitos T y B	Destrucción
Monocitos	Reducción significativa
Inmunoglobulinas	Reducción significativa
IgA	Reducción significativa
IgG	Escasa reducción
IgM	Reducción significativa
Factores de crecimiento	Muy variable
IGF ^b	Reducción significativa
TGF ^c	No afectado
Bacterias probióticas	Destrucción

^aLCPUFA: Ácidos grasos poliinsaturados de cadena corta; ^bIGF: Factor de crecimiento tipo insulina; ^cTGF: Factor de crecimiento transformante.

Adaptado de Gibbins (2013).

II. 1. 7. 3. Fortificantes de la leche humana

En el prematuro extremo, la leche humana sin fortificar puede resultar suficiente en las dos primeras semanas de vida pero, posteriormente, suele ser

nutricionalmente insuficiente por déficit de proteínas, calcio, fósforo y sodio, por lo que debe ser complementada (Henderson et al., 2005; Meier y Bode, 2013; Schanler y Atkinson, 1999; Tudehope, 2013). Con su uso, el RN prematuro menor de 32 semanas consigue un mayor crecimiento y masa ósea. Los fortificantes de leche humana son productos en polvo o líquidos con diferente composición. Todos contienen proteínas o aminoácidos, carbohidratos, minerales y vitaminas en diferentes cantidades, con el objetivo de que la leche humana complementada aporte entre 80 y 85 kcal/100 ml y mayor cantidad de sodio, calcio y fósforo (Bustos, 2008). Los tres comercializados en España se comparan en la Tabla 5.

Los fortificantes habitualmente se utilizan una vez que se ha alcanzado la alimentación enteral exclusiva con buena tolerancia. Se empieza con una concentración baja (1-2 gramos por 100 ml de leche) y se aumenta diariamente hasta alcanzar la cantidad deseada o la cantidad máxima recomendada por el fabricante. Las evidencias disponibles recomiendan individualizar la fortificación en cada RN para conseguir los aportes de energía recomendados en cada momento (Di Natale et al., 2011; Senterre y Rigo, 2011). En relación a la cantidad de proteínas administradas, existen dos procedimientos distintos, uno mediante una fortificación estándar, analizando la cantidad de proteína de la leche materna, y otra mediante una fortificación adaptada a la respuesta metabólica del RN basada en el estudio del nitrógeno ureico en sangre (Arslanoglu et al., 2010).

Los fortificantes son bastante homogéneos en cuanto a su contenido energético y proteico, pero varían en cuanto al tipo de proteínas y contenido graso, mineral, vitamínico y de lactosa. Debe extremarse el cuidado en la conservación de leches fortificadas ya que el crecimiento bacteriano es más rápido. Habitualmente se elaboran a partir proteínas hidrolizadas de leche de vaca para reducir las intolerancias y el riesgo de que algún niño padezca alergia a algunas de las proteínas de partida (Maggio et al., 2009; Reali et al., 2010).

Dependiendo de la presentación y de la cantidad de leche a administrar pueden ser más o menos fáciles de dosificar. Una vez añadido el producto a la leche, la dextrinomaltoza empieza a hidrolizarse, aumentando en unas horas la osmolaridad. Por este motivo, la leche fortificada no debe almacenarse más de unas pocas horas (Reali et al., 2010).

Tabla 5. Suplementos comerciales para la leche humana administrada a recién nacidos prematuros.

	FM85® (Nestlé)	Eoprotin® (Milupa)	Efamil® (Mead-Johnson)
Composición	1 g (sobres 1 g)	1 g (polvo en lata)	0,71 g (sobres)
Proteínas (g)	0,2	0,19	0,275
Tipo	Seroproteínas H	Proteínas H (caseína/suero, 40/60)	50% Caseína NH 50% Seroproteína H
Carbohidratos(g)	0,66	0,72	<0,10
Tipo	Dextrinomaltosa	Dextrinomaltosa	Polímeros de glucosa, lactosa
Grasas (g)	0,004	0,000	0,250
Tipo	Lecitina de soja	-	30% aceite de soja 70% TCM
Valor energético			
kJ	14,77	15,35	14,75
kcal	3,5	3,6	3,5
Vitamina A (µg ER)	30	30,9	72,5
Vitamina D (µg)	0,5	1,2	0,95
Vitamina E (mg ET)	0,4	0,6	0,7
Vitamina K (µg)	0,8	1,5	1,1
Vitamina C (mg)	2	2,9	3
Tiamina (µg)	10	31	37
Riboflavina (µg)	20	40	55
Niacina (mg)	0,2	0,6	0,8
Vitamina B6 (µg)	10	26	28
Ácido fólico (µg)	8,0	11,9	6,3
Vitamina B12 (µg)	0,02	0,05	0,05
Biotina (µg)	0,6	0,6	0,7
Ác. pantoténico (mg)	0,1	0,2	0,2
Sodio (mg)	4	2,35	4
Potasio (mg)	8,4	1,8	7,3
Cloro (mg)	3,4	1,7	3,3
Calcio (mg)	15	15,45	22,5
Fósforo (mg)	9	10,70	12,5
Magnesio (mg)	0,5	1,4	0,3
Hierro (mg)	0,3	0	0,4
Zinc (mg)	0,2	0,1	0,2
Cobre (µg)	8,0	6,2	11,0
Yodo (µg)	3,0	2,6	0,0
Selenio (µg)	0,3	0,0	0,0
Manganeso (µg)	1,0	1,9	2,5
Colina (mg)	0,1	0,0	0,0
Inositol (mg)	0,1	0,0	0,0
Osmolaridad (mOsm/l)	363 (al 5%)	355 (al 4,2%)	323 (al 2,84%)

Composición por 1 g de producto (obtenida de los fabricantes). ER, Equivalentes de Retinol; ET, Equivalentes de Tocoferol; TCM, Triacilglicéridos de Cadena Media. H: Hidrolizadas; NH: No Hidrolizadas. Fuente: Bustos (2008).

II. 1. 7. 4. Fórmulas infantiles

Las fórmulas infantiles representan la tercera opción, en orden de prioridad, para la alimentación de los prematuros y únicamente se deberían emplear cuando no sean posibles ninguna de las dos opciones anteriores (leche de la propia madre y LMD) ya que aumentan los riesgos a corto y largo plazo. En caso de utilizarse, hay evidencias de que las fórmulas específicas para neonatos pretérmino tienen beneficios sobre las fórmulas de inicio convencionales en los nacidos con menos de 32 semanas de gestación: mejor desarrollo psicomotor a los 18 meses, mejor crecimiento y mayor masa ósea (Bustos, 2008). Estas ventajas no se encuentran en etapas posteriores de la infancia. No se dispone de información válida para recomendar su uso en pretérminos de 32 ó más semanas de gestación.

La composición adecuada de estas fórmulas es aún objeto de controversia y la de cada marca comercial es ligeramente diferente (Tabla 6). Esto es un reflejo de que los requerimientos nutricionales de los nacidos pretérmino no están definitivamente establecidos, especialmente en los más inmaduros y en los que tuvieron crecimiento intrauterino retardado y, particularmente, en lo concerniente a la relación energía/proteína, la composición de las grasas y el contenido en calcio, fósforo, sodio, cloro, yodo y vitaminas A y D. En cualquier caso, la Tabla 7 muestra los requerimientos de proteínas y energía comúnmente aceptados según el PN (Ziegler et al., 2002). En su formulación se emplea la lactosa como fuente principal de hidratos de carbono aunque, en ocasiones, se combina con otras fuentes, como las maltodextrinas, por su bajo coste y fácil digestión. La principal función de las proteínas en el prematuro es trófica, es decir, la formación de tejidos, por lo que deben predominar las proteínas del suero (2,25-3,1g/100 kcal). La síntesis de L-carnitina en el hígado, riñones y cerebro del prematuro es escasa, por lo que se suele añadir en estos preparados. Las grasas deben aportar entre el 40 y 50% de la energía. El contenido en ácidos grasos esenciales linoleico y linolénico es importante; considerándose adecuado el aporte de 0,5-0,7g/100 kcal y 70-150 g/100 kcal, respectivamente. La escasa capacidad para elongar estos ácidos grasos hace que los ácidos araquidónico y docosahexaenoico sean esenciales en el prematuro. El enriquecimiento en estos ácidos grasos puede realizarse por su adición en forma pura o mediante el uso de huevo o pescado como fuentes lipídicas. Hay estudios que sugieren que se obtienen mejores resultados neurológicos a corto plazo cuando se administran cantidades de ácido docosahexaenoico entre dos y tres veces superiores a las que tienen las fórmulas artificiales para prematuros que se comercializan actualmente (Lapillonne et al., 2013).

Tabla 6. Composición (%) y características de las fórmulas de prematuros disponibles en el mercado (por 100 g de producto).

	HC	Fuente de HC	Proteínas	Caseínas/ Seroproteínas	Grasas	Kcal	PUFAs	Otros
PreAdapta	56,4	L/M	14,9 ^a	40/60	25,9	519	SI	T, C, S
Adapta PEG	52,7	L	12,4	40/60	29,6	527	SI	C, S
Almirón Neonatal	50,6	L/M	15,6	40/60	28,5 ^{b,c}	521	SI	T, C, S
Pre-Aptamil H.A.	48,8	L/M	15,2 ^a	0/100	27,8 ^c	506	SI	T, C, S
Blemil plus prematuros	54,7	L/M	14,5	35/65	25,8 ^d	509	SI	T, C, S
Enfalac prematuros	55	L/PG	14,5	40/60	25 ^e	490	SI	T, C
Alprem	53,6	L/M	13,6 ^a	22/78	26 ^f	506	SI	T, C
Nutribén R.N. bajo peso	53,9	L/M	12,9	45/55	27,3	510	SI	T, A
Similac special Neo	52,8	L/M	13,3	47/53	28,2 ^g	513	NO	T, C, S, N

A: L-arginina; C: L-carnitina; HC: hidratos de carbono; L: lactosa; PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga; M: maltodextrina; N: nucleótidos; PG: polímeros de glucosa; S: selenio; T: taurina

^aProteína hidrolizada; ^b β -Palmitato (45%); ^cSin triglicéridos de cadena media; ^d10% de triglicéridos cadena media; ^e40% de triglicéridos cadena media; ^f30% de triglicéridos cadena media; ^h25% de triglicéridos cadena media.

Fuente: Cilleruelo (2004).

Tabla 7. Requerimientos estimados de proteínas y energía para la alimentación enteral, por grupo de peso.

Peso RN (g)	500-700	700-900	900-1200	1200-1500	1500-1800
Ganancia de peso fetal (g/kg/día)	21	20	19	18	16
Proteínas (g/kg/día)					
Pérdidas	1	1	1	1	1
Crecimiento	2,5	2,5	2,5	2,4	2,2
Necesidades	4	4	4	3,9	3,6
Energía (kcal/kg/día)					
Pérdidas					
Basales en reposo	45	45	50	50	50
Otros consumos	15	15	15	20	20
Crecimiento	29	32	36	38	39
Necesidades	105	108	119	127	128
Proteína/energía (g/100 kcal)	3,8	3,7	3,4	3,1	2,8

Fuente: Ziegler et al. (2002).

Entre los minerales, cabe destacar que contienen complementos de sodio, calcio y fósforo y que suelen aportar también mayor cantidad de algunas vitaminas e inositol. La composición de cada fórmula es fácilmente accesible en la publicidad de las empresas y en las correspondientes páginas web.

II. 1. 7. 5. Nutrición parenteral y enteral

La progresión del RN prematuro hacia el ideal de alimentarse completamente a través del pecho de su propia madre puede pasar por una serie de etapas en las que se debe utilizar diferentes formas de nutrición: parenteral, enteral y oral.

La nutrición parenteral es necesaria en aquellos niños en los que la alimentación enteral pueda estar contraindicada debido a su inmadurez o a cualquier problema médico (Rosal et al., 2008). Básicamente consiste en la administración por vía intravenosa de una solución de glucosa y aminoácidos con electrolitos, minerales y vitaminas, además de grasas como principal fuente de energía no proteica. Las soluciones se preparan normalmente en una farmacia especializada para reducir al mínimo el riesgo de contaminación microbiana. La bacteriemia es la complicación más común de la nutrición parenteral (Tabla 8). La administración mediante un catéter venoso central no se ha relacionado con mayores riesgos de infección que cuando se usan las vías periféricas. En estas últimas, hay que tener cuidado con las lesiones por extravasación periférica. La infiltración subcutánea de una solución hipertónica e irritante puede causar ulceración local de la piel, infección secundaria y cicatrización.

Tabla 8. Complicaciones asociadas a la nutrición parenteral.

Complicaciones relacionadas con el catéter	Complicaciones metabólicas
Bacteriemia (estafilocócica)	Ictericia colestásica
Infección fúngica invasiva	Hiperglucemia o glucosuria
Trombosis	Déficits o excesos de vitaminas
Lesiones por extravasación	Hiperamonemia
Taponamiento cardíaco	

La nutrición enteral se refiere a la administración intragástrica de cualquier líquido o alimento a través de una sonda de plástico que pasa, a través de la nariz o la boca, directamente al estómago. Esta técnica se aplica en los menores de 32 semanas, pero se puede extender hasta las 34 - 35

semanas, dependiendo del estado de desarrollo. Para la inserción de estas sondas es necesario tener un buen entrenamiento previo. La sonda nasogástrica (SNG) se utiliza más que la orogástrica en los menores de 32 semanas porque es más fácil su fijación y mantenimiento. No obstante, las SNG ocluyen parcial o totalmente un orificio nasal y aumentan la resistencia de las vías aéreas superiores y el riesgo de desaturación y apnea (Edmond y Bahl, 2008), por lo que no es conveniente su utilización en los prematuros que tienen una función respiratoria alterada.

Dado que los pretérminos con menos de 32 semanas de gestación no suelen tolerar la alimentación enteral en los primeros días de vida, durante años ha sido práctica habitual en muchos centros no iniciar la alimentación enteral en la primera semana de vida. Sin embargo, la administración de pequeñas cantidades de leche (de 5 a 20 ml/kg/día) desde el primer día no incrementa el riesgo de NEC y acorta el tiempo en que se alcanza la alimentación enteral completa y la hospitalización. A esta alimentación mínima se la conoce también como alimentación "trófica" para el intestino, como se ha comentado anteriormente (Bustos, 2008).

La administración intragástrica puede ser fraccionada (generalmente por gravedad o por bomba de jeringa) o continua (en 3 - 4 h a través de una bomba de jeringa). No es conveniente que la alimentación continua se mantenga más de 4 horas porque los lípidos se adhieren a las paredes del tubo, disminuyendo su aporte. La alimentación fraccionada, dejando períodos de ayuno, parece acortar el tiempo en el que se alcanza la nutrición enteral completa en los pretérmino (Premji y Chessell, 2011). Un aspecto a considerar es el tiempo de administración del alimento por gravedad, es decir, en bolo. La capacidad gástrica de los pretérmino es limitada y el vaciado gástrico es lento. Cuando se alcanza la cantidad máxima de aporte enteral, la administración rápida puede producir distensión gástrica, dificultad respiratoria, regurgitación y, en ocasiones, apnea. En estos casos es preferible administrar el bolo en un tiempo más fisiológico, similar a la duración de una toma, es decir, unos 20 - 30 minutos. También hay que considerar la posibilidad de dar tomas de menor volumen pero más frecuentes (por ejemplo, 12 al día). En general se acepta que incrementos de hasta 20 ml/kg/día son seguros con cualquier tipo de leche, si no aparecen signos de intolerancia. Sin embargo, la práctica con leche humana en muchos centros es incrementar hasta 30 ml/kg/día en pretérminos estables, hasta alcanzar la alimentación enteral completa. Si no hay circunstancias clínicas que lo contraindiquen, y toleran estos aumentos progresivos, se puede conseguir nutrición enteral completa en la primera mitad de la segunda semana de vida.

En la fase de aumento de aportes enterales al igual que cuando se ha alcanzado la alimentación enteral completa, debe vigilarse los signos de intolerancia: distensión abdominal clínicamente importante y vómitos (especialmente si son biliosos o sanguinolentos). Además, cuando se aprecian

signos de intolerancia digestiva franca, íleo paralítico u obstrucción intestinal, la alimentación enteral está contraindicada cuando existe inestabilidad hemodinámica, definida por la situación de shock o la hipotensión que precisa administración de dopamina a dosis de 10 µg/kg/minuto o superiores; en esta situación, hay un grave compromiso del flujo sanguíneo mesentérico.

II. 1. 7. 6. Monitorización del crecimiento y la ganancia ponderal

Hoy por hoy el objetivo de alcanzar un crecimiento similar al fetal en los RN prematuros de ≤ 32 semanas no es realista. En la práctica habitual se considera que es muy importante monitorizar la velocidad de crecimiento y la ganancia ponderal, a pesar de que el estándar para estos niños no está definido. La desnutrición fetal, y probablemente la neonatal, puede desencadenar mecanismos adaptativos, como la resistencia a la insulina que, perpetuados en edades posteriores, pueden conducir a mayor riesgo cardiovascular y menor esperanza de vida. Tampoco se sabe cual es el tiempo óptimo para lograr alcanzar los valores normales de peso y longitud. La vigilancia se suele centrar en evitar, en lo posible, la desnutrición grave. Para este propósito, durante el ingreso hospitalario se utilizan habitualmente las curvas de Ehrenkranz (1999). Una vez alcanzada la edad postmenstrual correspondiente a 40 semanas, deben utilizarse las gráficas poblacionales adecuadas. La OMS recomienda utilizar sus gráficas para todos los lactantes y niños pequeños, elaboradas con una muestra multiétnica de niños amamantados (OMS, 2009).

El RN presenta diferentes estadios en su adaptación a la vida extrauterina. Tras el nacimiento tiene lugar una pérdida de líquido y electrolitos, por lo que se recomienda el aporte hídrico y monitorización de los principales electrolitos (sodio, potasio, cloro), por si fuese necesaria su suplementación. La pérdida de peso al nacimiento se recupera en días sucesivos (entre los días 5 y 15), para finalmente iniciar el crecimiento. El aumento de peso tiene lugar a un ritmo de unos 20 mg/kg/día.

Las prácticas recomendadas en esta población son la rápida provisión de energía (6 mg/kg/min de glucosa) y aminoácidos parenterales (3mg/kg/día) en las primeras horas de vida, el aporte lipídico (0,5-1 g/kg/día) en los primeros días de vida y el inicio temprano de la nutrición enteral trófica (en los primeros 5 días de vida), a ser posible con leche de la propia madre (10 ml/kg/día con un aumento progresivo de hasta 150 ml/kg/día) (Su, 2013). Entre las estrategias para alcanzar un crecimiento equiparable al intrauterino están la fortificación de la leche humana, el uso de fórmulas de alto valor nutricional y la adición proteica hasta límites de tolerancia metabólica (Whyte, 2012). El aporte energético y nutricional se irá aumentando progresivamente con el peso y la talla del RN, al ritmo más adecuado en función de su tolerancia

(Whyte, 2012). La leche humana, como se ha comentado anteriormente, es el alimento de elección para la administración enteral por su mejor tolerancia, absorción y biodisponibilidad. En el caso de los niños prematuros, como la disponibilidad de leche de la propia madre es más complicada, se potencia el uso de LMD. Únicamente en el caso de no disponer de ninguna de ellas se emplearán fórmulas infantiles (Bustos, 2008; Whyte, 2012). La ganancia de peso debe evaluarse diariamente.

El método canguro, o contacto piel con piel, se potencia en la mayoría de las UCIN por sus ventajas para el RN y sus padres. Entre los beneficios observados en el RN destacan el mayor desarrollo fisiológico, la mejora de las complicaciones respiratorias, la autonomía y el desarrollo cognitivo, mejor organización del patrón de sueño y menor ansiedad (Feldman et al., 2014; Ludington-Hoe, 2013; Scher et al., 2009). Así mismo, en los padres se ha observado menor ansiedad tanto al nacimiento como durante la hospitalización del RN. Actualmente se potencia la inclusión de la familia en las terapias de desarrollo del neonato. Sin embargo, para obtener sus beneficios se requieren tiempos prolongados de contacto piel con piel que, a menudo, son difíciles de compaginar con el día a día de los padres durante los largos periodos de estancia hospitalaria. La flexibilidad de los centros para adaptarse a las necesidades de las familias es imprescindible para que pueda llevarse a cabo de forma efectiva.

II. 2. LA MICROBIOTA GASTROINTESTINAL

El interés por la microbiota humana y su relación con la salud ha aumentado notablemente en los últimos años. El término *microbiota* se define como el conjunto de microorganismos que pueblan un hábitat y que, en este caso, conviven e interactúan con un hospedador. Cada persona adulta alberga aproximadamente 10^{13} células humanas y 10^{14} células microbianas, por lo que tan sólo el 10% de las células que contiene son humanas. Pese a su pequeño tamaño, el conjunto de bacterias presentes en el ser humano representa en torno al 2% de nuestra masa corporal, equiparándose en tamaño a órganos vitales como el hígado o cerebro (Warinner et al., 2014).

Cada una de nuestras células humanas contiene un genoma (~3 Gbases) que consta de 23.000 genes mientras que la microbiota aporta entre 2 y 20 millones de genes (~500 Gbases), constituyendo por tanto entre el 99 y el 99,9% de los genes existentes en nuestro cuerpo (Fig. 14). El conjunto de genes de todos los microorganismos de la microbiota humana se denomina *microbioma* humano. El microbioma contribuye de una forma muy relevante a la diversidad genómica humana ya que, globalmente, los individuos humanos compartimos un 99,9% del genoma humano pero únicamente un 10% de nuestro microbioma.

En otras palabras, sería más apropiado vernos a nosotros mismos como un conjunto de muchas especies, en el que nuestro bagaje genético está integrado tanto por los genes humanos como por los genomas de nuestros socios microbianos. El conjunto del genoma humano y del genoma de los distintos microorganismos que nos habitan constituye el *metagenoma* humano. En consecuencia, los humanos somos superorganismos cuyo metabolismo representa una amalgama de propiedades microbianas y humanas. De hecho, nuestra microbiota se comporta como un auténtico órgano funcional, a menudo infravalorado, ya que: (a) está compuesta por diferentes “líneas celulares” con capacidad de comunicarse entre ellas y con el hospedador; (b) consume, almacena y redistribuye energía; (c) interviene en transformaciones químicas esenciales para la fisiología del hospedador; y (d) es capaz de mantenerse y repararse por sí misma mediante procesos de autorreplicación (Macpherson y Harris, 2004; Matamoros et al., 2013; Schéle et al., 2015; Scholtens et al., 2012; Sharon et al., 2013).

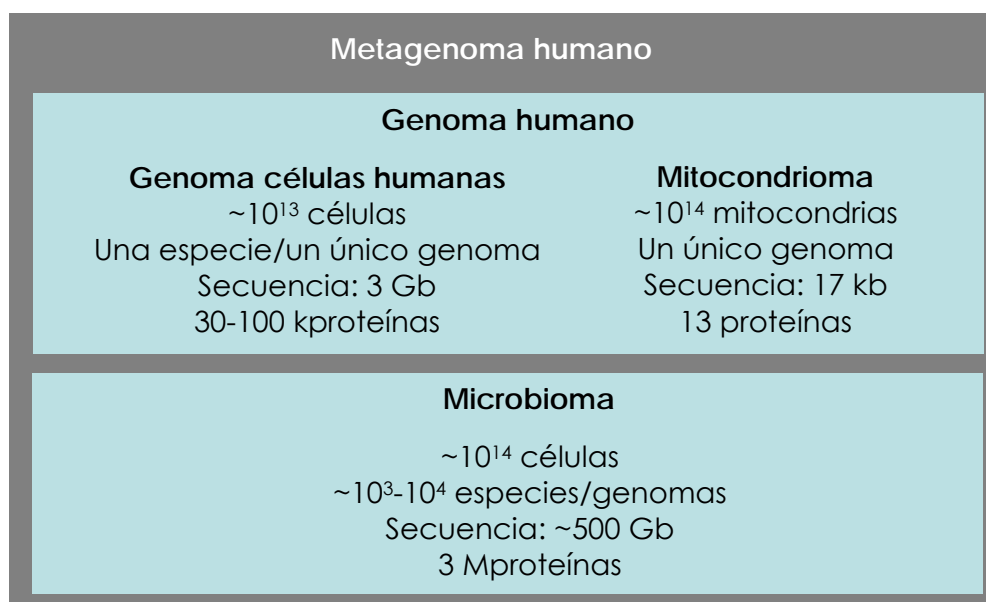


Figura 14. Relevancia del microbioma, nuestro “otro genoma”. Adaptado de Qin (2010).

Por otra parte, cada una de las mucosas y superficies epiteliales existentes en los diferentes aparatos y sistemas constituyen microambientes específicos, cuyas características determinan la composición cualitativa y cuantitativa de las poblaciones microbianas que allí habitan en condiciones fisiológicas (Fig. 15). La alteración de estas condiciones puede originar situaciones de disbiosis que, si son intensas y/o se prolongan en el tiempo, pueden dar lugar a la aparición de diversas patologías o enfermedades.

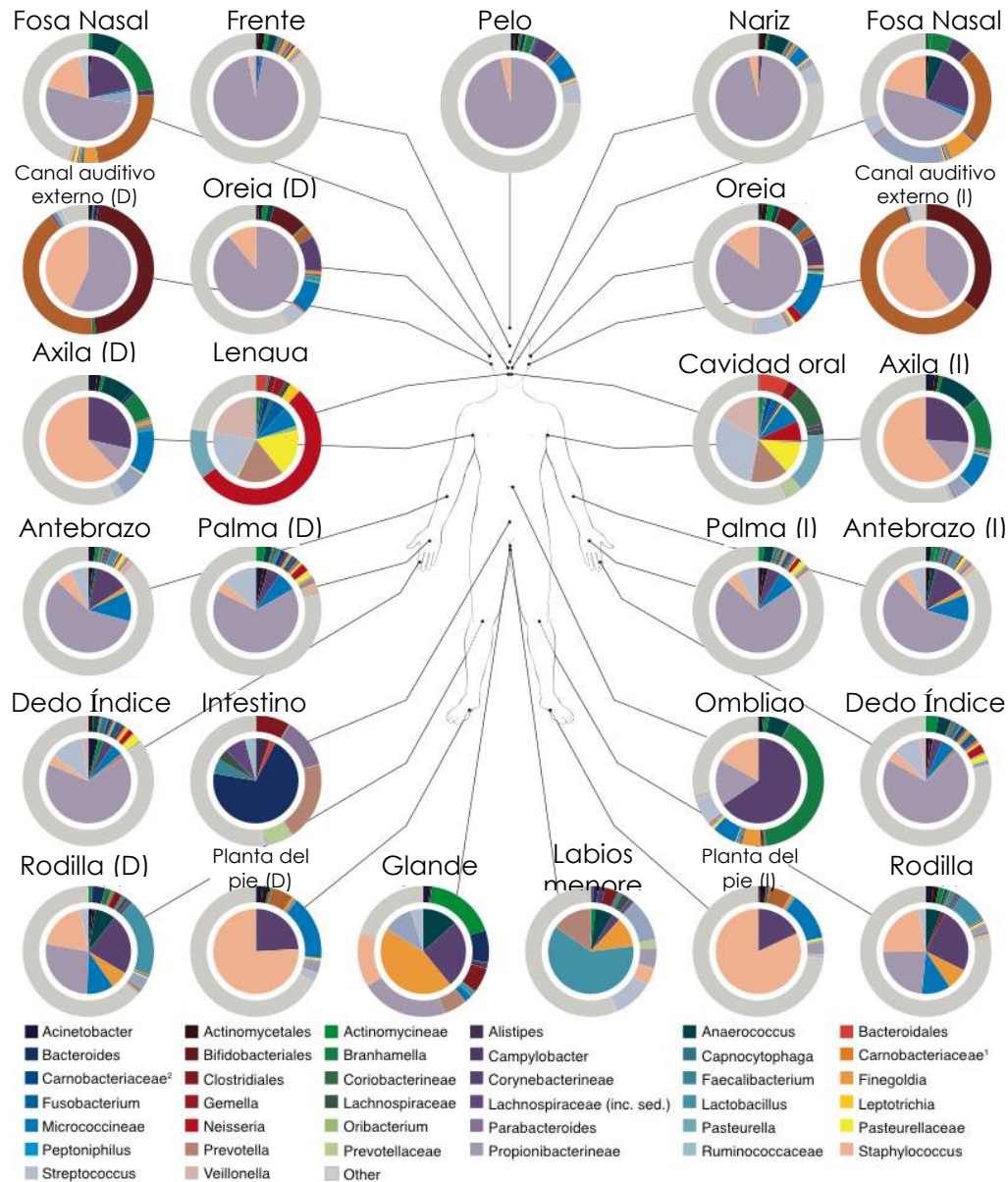


Figura 15. Diversidad del microbioma humano. Adaptación de Costello (2009).

En los últimos años, los avances en tecnologías clásicas, junto con el desarrollo de otras nuevas y su aplicación conjunta, han facilitado el estudio de la microbiota y del microbioma humano, a pesar de que todavía existen muchos aspectos eminentemente desconocidos en la actualidad.

II. 2. 1. Diversidad de la microbiota gastrointestinal

La composición del microbioma humano es el resultado de miles de años de evolución y presión selectiva hasta alcanzar un estado de equilibrio

que resulta beneficioso tanto para el hospedador como para los microorganismos que alberga (Ley et al., 2006). El término *diversidad* hace referencia tanto al número de especies de un ecosistema como a su abundancia relativa. La diversidad de las poblaciones microbianas existentes en el TGI humano es una de las más amplias del organismo aunque varía notablemente a lo largo del mismo, siendo máxima en el colon. El TGI está sometido a la acción de diversas secreciones que llevan a cabo la degradación de los alimentos para que los principios inmediatos puedan ser absorbidos, obteniendo así la energía y las materias primas necesarias para la formación y reparación de los tejidos corporales y, en consecuencia, para el crecimiento. Los componentes de la dieta, junto con la composición de las distintas secreciones y otros factores, como el peristaltismo o los cambios de pH, determinan la colonización de las distintas partes del TGI.

Entre los más de 50 filos bacterianos descritos hasta la fecha, tan sólo 4 (*Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*) son abundantes en la microbiota humana mientras que los restantes 9 filos (*Chlamydiae*, *Cyanobacteria*, *Deferribacteres*, *Deinococcus-Thermus*, *Fusobacteria*, *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia* y los candidatos a filo TM7 y SR1) que se pueden encontrar en nuestra especie tienen una representación mucho más escasa (Dethlefsen et al., 2007; El Aidy et al., 2015). Al nivel de filo, los cambios que tienen lugar a lo largo del aparato digestivo se caracterizan por la disminución progresiva de *Firmicutes* desde la cavidad oral, donde es predominante (~75%), hasta el estómago y el intestino donde representa porcentajes de ~50 y 52%, respectivamente. En contraste, la presencia de *Bacteroidetes* tiende a aumentar desde la boca (~25%) al intestino (~45%), aunque alcanza concentraciones mínimas en el estómago (~20%) (Dethlefsen et al., 2007). A continuación, se describirá con mayor detalle los niveles taxonómicos inferiores presentes en el estómago y el intestino humano.

Hasta hace pocos años se consideraba que el estómago era un ambiente inhóspito para los microorganismos debido a sus peculiares condiciones ambientales (bajo pH, elevado peristaltismo,...). No obstante, los avances técnicos han permitido recientemente la descripción de una microbiota diversa, dominada por los filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Fusobacteria*, y en la que *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Prevotella* parecen ser los géneros dominantes (Abreu y Peek, 2014; Avilés-Jimenez et al., 2014; Bik et al., 2006; Dicksved et al., 2009; Engstrand y Lindberg, 2013; Mattarelli et al., 2014; Wang et al., 2014). En cualquier caso, su diversidad y concentración (10^1 - 10^3 UFC/ml) son menores que las existentes en la cavidad oral o en el colon (Bik et al., 2006).

El intestino, y especialmente el colon, es la parte del cuerpo humano que ha atraído un mayor número de estudios relacionados con la microbiota. El intestino, con sus, aproximadamente, 7,5 metros de longitud y 300 m² de superficie, constituye la principal superficie de intercambio y comunicación

con el exterior. Además, su compleja interacción con los sistemas nervioso, endocrino e inmunitario, resulta fundamental para la homeostasis. En el intestino delgado, la colonización bacteriana está condicionada por un tránsito rápido y la presencia de ácido gástrico, bilis y secreción pancreática pero, aún así, se alcanzan densidades que oscilan entre los 10^4 UFC/g del yeyuno y los 10^7 UFC/g del final del ileon (Guarner y Malagelada, 2003). Entre los microorganismos presentes en esta parte del TGI destacan diversas especies de los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus*, así como algunas bacterias anaerobias estrictas ácidotolerantes (Mackie et al., 1999).

El intestino grueso es el más densamente poblado, alcanzando concentraciones microbianas de 10^{11} - 10^{12} UFC/g. El tránsito se ralentiza, favoreciendo la actividad de las poblaciones microbianas residentes, que son capaces de metabolizar restos de alimentos no digeribles en otras zonas del aparato digestivo. El estudio de la microbiota colónica se ha centrado en el análisis de las poblaciones presentes en heces, por ser una muestra cuya obtención es sencilla y no requiere el empleo de medios invasivos. Sin embargo, el estudio de la microbiota adherida a la mucosa intestinal ha revelado importantes diferencias con la que está presente en las heces (Zoetendal et al., 2002).

La microbiota residente en el intestino grueso se ha descrito como específica de cada hospedador y relativamente estable aunque se observan cambios dependiendo de la edad (Zoetendal et al., 2002). Constituye el 60% del contenido fecal sólido y está formada por más de 400 especies, destacando la presencia de anaerobios estrictos, que son entre 100 y 1.000 veces más abundantes que los aerobios, y que están representados en un 99% por miembros de los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (Arumugam et al., 2011; Edwards y Parrett, 2002; Gill et al., 2006; Guarner y Malagelada, 2003; Mariat et al., 2009). El ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* ha sido intensamente estudiado por su relación con uno de los trastornos más prevalentes en la actualidad tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo: obesidades síndrome metabólico. Sin embargo, este ratio no se mantiene estable a lo largo de la vida del individuo sino que presenta valores bajos en niños y ancianos (0,4 y 0,6 respectivamente) y aumenta considerablemente en los individuos adultos (ratio 10,9).

Los principales géneros que se detectan en heces son *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* y *Ruminococcus* (Adlerberth y Wold, 2009). Los anaerobios facultativos constituyen menos del 1% e incluyen principalmente a la familia *Enterobacteriaceae* y a los géneros *Enterococcus* y *Lactobacillus*, este último presente en el 80% de los adultos. Un pequeño porcentaje de individuos sanos (~35%) también puede contener levaduras, principalmente del género *Candida*, aunque suelen estar presentes en bajas concentraciones ($<10^5$ UFC/g).

Cada individuo alcanza la homeostasis microbiana hacia los tres años de edad, con una composición que se mantiene relativamente estable a lo largo de la vida adulta. Pese a la variabilidad individual observada, se han descrito 3 enterotipos distintos; cada uno se caracteriza por la dominancia de unas pocas especies y la presencia de otras muchas que, aunque se encuentran en pequeñas cantidades, pueden ser importantes para la salud (Arumugam et al., 2011; Ottman et al., 2012). Las especies más abundantes son las responsables de la selección de las poblaciones minoritarias. De esta manera, el enterotipo 1 está enriquecido en los géneros *Bacteroides* y *Parabacteroides*, en el enterotipo 2 dominan *Prevotella* y *Desulfovibrio*, mientras que el tercero (y más frecuente) está principalmente representado por *Ruminococcus* y *Akkermansia*. Cada enterotipo muestra preferencia al empleo de unas u otras rutas metabólicas para la obtención de energía (Arumugam et al., 2011) (Fig. 16). A pesar de la descripción de diferentes enterotipos, todo parece indicar que existe una alta redundancia funcional, con un núcleo funcional bacteriano que comparte entre el 25 y 43% de las funciones enzimáticas y que es independiente del enterotipo al que se pertenezca (Turnbaugh et al., 2009; Vael y Desager, 2009). Una vez alcanzado el estado de equilibrio, la microbiota puede sufrir alteraciones temporales o permanentes como consecuencia de diversos factores, incluyendo el sufrimiento de ciertas enfermedades, los tratamientos con antibióticos, los cambios en la dieta o las situaciones de estrés (Adlerberth y Wold, 2009; Doré y Corthier, 2010; Guarner y Malagelada, 2003).

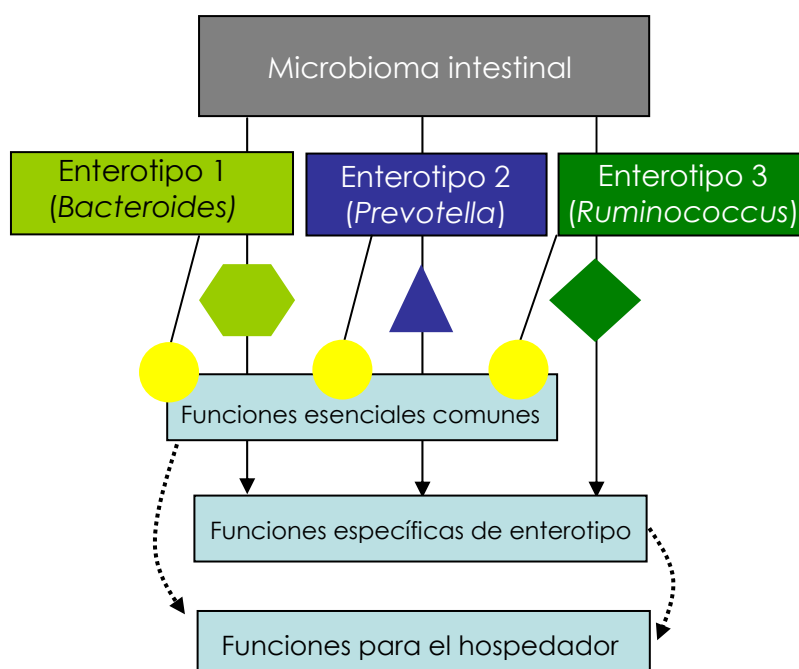


Figura 16. Propuesta de clasificación del microbioma intestinal humano en enterotipos. Fuente: Arumugam (2011).

En la vejez tienen lugar numerosos cambios pato-fisiológicos que nuevamente modulan la microbiota. No se ha definido el momento concreto en que estos cambios comienzan pero existen numerosos factores interindividuales, como los cambios nutricionales y en el estilo de vida, la mayor frecuencia de infecciones y enfermedades inflamatorias, la medicación requerida, la ralentización del tránsito gastrointestinal o la menor producción de secreciones digestivas, que parecen ser determinantes en la alteración de las poblaciones bacterianas presentes en el TGI del anciano. Estos cambios se caracterizan por la reducción de la diversidad global, un descenso de las poblaciones de los géneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* y *Clostridium* y un aumento del filo *Proteobacteria*, principalmente de algunos de sus miembros que pueden actuar como patógenos oportunistas (Mariat et al., 2009; Ottman et al., 2012) (Fig. 17).

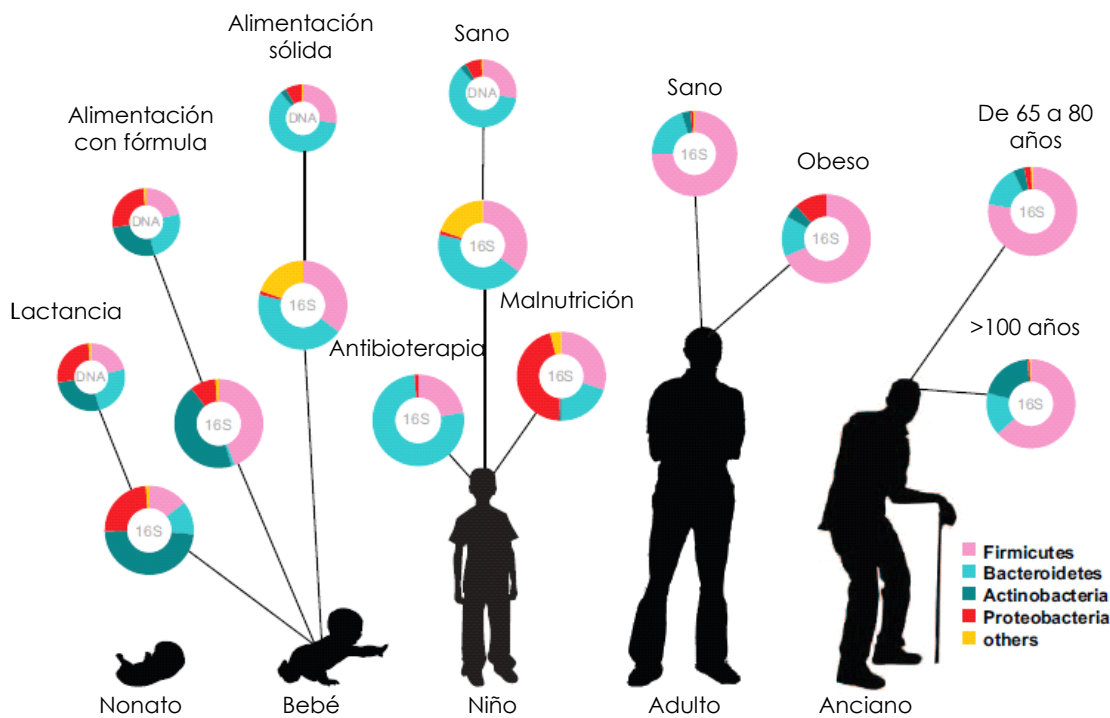


Figura 17. Microbiota intestinal humana. Inicio y modulación en diferentes estadios de la vida y situaciones de perturbación. Visión global de la abundancia relativa a nivel de filo, medida por 16S o metagenómica (DNA). Fuente: Adaptación Ottman et al. (2012).

En los últimos años distintos grupos de investigación se han esforzado por definir la composición y características de una “microbiota sana”, una tarea difícil si no imposible. Los cambios experimentados por las sociedades occidentales en las últimas décadas (dieta altamente procesada y enriquecida en azúcares, grasas y aditivos, aumento de la higiene, amplia

exposición a antibióticos, estilo de vida sedentario...) se han relacionado con una mayor presencia de *Firmicutes* y una reducción de *Bacteroides* y *Prevotella* (relacionados con la digestión de polisacáridos vegetales). Estos cambios se asocian con una mayor tendencia a la inflamación que podría ser la responsable del aumento de la incidencia de enfermedades o síndromes como la diabetes de tipo 2, la obesidad, las alergias e intolerancias alimentarias o las enfermedades inflamatorias intestinales (Bengmark, 2013; Clemente et al., 2015; Spreadbury, 2012; Warinner et al., 2014; Yatsunen et al., 2012).

II. 2. 2. Adquisición y evolución de la microbiota intestinal infantil

La colonización microbiana del TGI infantil es un proceso esencial en nuestra vida puesto que cada vez resulta más evidente que las interacciones iniciales que se establecen entre la microbiota y su hospedador tienen consecuencias importantes para la salud a corto, medio y largo plazo.

II. 2. 2. 1. Periodo fetal

Desde los estudios clásicos de Tissier (1900) sobre la adquisición de la microbiota intestinal infantil, se ha aceptado la idea de que los fetos son estériles *in utero* y que la colonización bacteriana del intestino se inicia durante el tránsito por el canal del parto, por contaminación a partir de la microbiota vaginal e intestinal de la madre (Isolauri et al., 2001; Mackie et al., 1999; Tannock, 1995; Tissier et al., 1900), a pesar de la ausencia de evidencias científicas. Según dicha hipótesis, la composición inicial de la microbiota intestinal estaría determinada fundamentalmente por el tipo de nacimiento y la alimentación del RN (Mackie et al., 1999). Por su parte, la principal fuente de bacterias para los niños nacidos por cesárea sería el ambiente hospitalario, incluyendo el instrumental, los equipos y la presencia de otros neonatos y del personal médico (Lennox-King et al., 1976a; Lennox-King et al., 1976b). Este punto de vista se basa en el hecho de que, durante décadas, los análisis microbiológicos de muestras biológicas relacionadas con el embarazo (corioamnios, líquido amniótico, meconio...) se llevaban a cabo únicamente en aquellos casos en que los que la presencia de una infección intrauterina era evidente. De hecho, varios estudios han encontrado una fuerte correlación entre las infecciones intrauterinas y el PPT (DiGiulio et al., 2008; Goldenberg et al., 2008).

Por el contrario, pocos estudios han examinado la microbiota uterina asociada a embarazos sanos a término, en parte debido a la perdurable influencia del paradigma del útero estéril, pero también a las dificultades éticas y técnicas para la obtención de muestras durante embarazos

saludables. Sin embargo, estudios más recientes sobre la posible transmisión de bacterias a través de la barrera placentaria en condiciones fisiológicas han mostrado la existencia de bacterias (incluyendo especies de los géneros *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*) en muestras de líquido amniótico, sangre de cordón umbilical y membranas fetales en ausencia de infección o inflamación (Bearfield et al., 2002; Jimenez et al., 2005; Jiménez et al., 2008c; Rautava et al., 2012). El microbioma placentario se caracteriza, en condiciones fisiológicas, por la predominancia de especies comensales que, aunque son poco abundantes, aportan gran riqueza metabólica. Los filos dominantes son *Firmicutes*, *Tenericutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroides* y *Fusobacteria*. En contraste, el PPT se relaciona con una mayor presencia de miembros de los órdenes *Actinomycetales* y *Alphaproteobacteria*, y del género *Burkholderia* (Aagaard et al., 2014). Un trabajo anterior reveló que algunos microorganismos que colonizan la placenta, como *Prevotella* spp. y *Gardnerella* spp., pueden provocar respuestas inflamatorias específicas en los neonatos, mientras que otros, como *Lactobacillus* spp., pueden suprimir estas respuestas (Fichorova et al., 2011).

Para probar si ciertas bacterias intestinales maternas pueden colonizar el útero, dos estudios pioneros demostraron que la administración oral de una cepa marcada de *Enterococcus faecium* a ratonas gestantes daba lugar a su presencia en el líquido amniótico y meconio de las crías obtenidas por cesárea (Jiménez et al., 2005; Jiménez et al., 2008a).

Por otra parte, el meconio tampoco es estéril, como se suponía anteriormente, sino que alberga una compleja comunidad microbiana propia que difiere de la existente en las heces infantiles (Ardisson et al., 2014; Gosalbes et al., 2013; Hu et al., 2013; Jiménez et al., 2008c). El meconio se considera un reflejo de la materia fecal acumulada durante la gestación y, por tanto, su contenido microbiano es un fiel reflejo de la colonización prenatal del intestino.

Los estudios citados anteriormente sugieren que la colonización bacteriana del intestino humano es un proceso complejo que se inicia, a pequeña escala, en las últimas fases del periodo fetal (Funkhouser y Bordenstein, 2013) (Fig. 18).

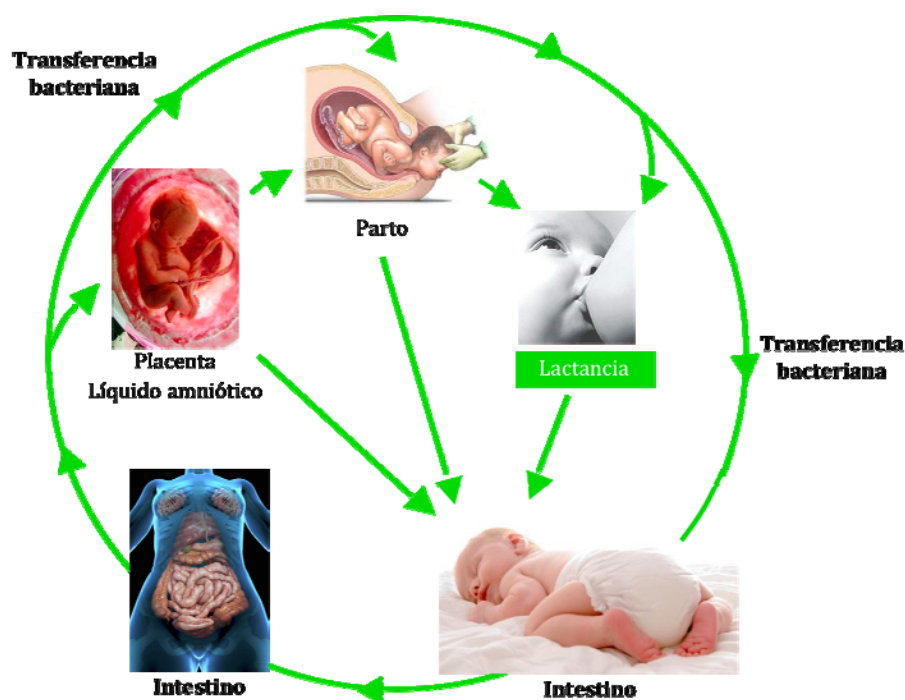


Figura 18. Fuentes de transmisión vertical de microorganismos entre la madre y su hijo durante el embarazo, parto y periodo postnatal.

II. 2. 2. 2. Nacimiento y periodo postnatal

Tras el nacimiento, el proceso de colonización se intensifica drásticamente debido al contacto del neonato con microorganismos procedentes de las microbiotas vaginal, intestinal y/o mamaria de la madre y del medio ambiente que le rodea (Buddington et al., 2010; Mackie et al., 1999; Martín et al., 2007a; Martín et al., 2009; Sharon et al., 2013). En consecuencia, diversos factores, como la composición de la microbiota materna, la EG, la forma y lugar de nacimiento, la medicación (particularmente la antibioterapia) o la alimentación, juegan papeles claves en un proceso del que dependen funciones tan importantes como la absorción de nutrientes, la formación de una barrera frente a patógenos, el neurodesarrollo o la maduración del sistema inmunitario (Adlerberth y Wold, 2009; Biasucci et al., 2010; Domínguez-Bello et al., 2010; Hooper y Gordon, 2001; Hopkins et al., 2005; Johnson y Versalovic, 2012; Martino et al., 2008; Morelli, 2008; Mshvildadze et al., 2010; Penders et al., 2006) (Fig. 19).

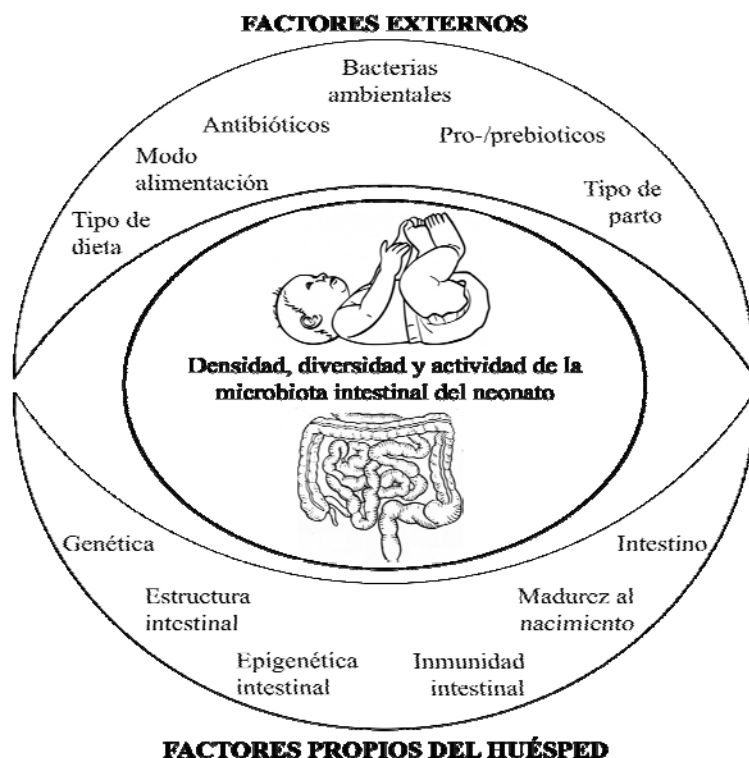


Figura 19. La colonización del intestino neonatal está determinada por factores externos e internos. Fuente: Adaptado de Cillieborg (2012).

Las primeras semanas de vida constituyen el periodo más dinámico en el ecosistema gastrointestinal. La microbiota infantil se caracteriza por concentraciones bacterianas más bajas que las existentes en el intestino de un adulto, por la mayor abundancia de bifidobacterias, *Clostridium leptum* y *Clostridium coccoides*, anaerobios facultativos y por una menor tasa *Firmicutes/Bacteroidetes* (Adlerberth y Wold, 2009; Mariat et al., 2009). Además, en esta fase, diversas bacterias anaerobias facultativas (estreptococos, estafilococos, bacterias lácticas, enterobacterias) colonizan y dominan el intestino infantil (Jiménez et al., 2008b). La presencia de tales bacterias resulta crítica ya que son esenciales para la modulación inicial del sistema inmunitario y la creación de un ambiente reductor que permita el desarrollo y dominio posterior de bacterias anaerobias estrictas, como las pertenecientes a diversas especies de los géneros *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Eubacterium*, *Ruminococcus* o *Clostridium* (Adlerberth y Wold, 2008; Echarri et al., 2011; Johnson, 2012; Matamoros et al., 2013; Sakata et al., 1985; Scholtens et al., 2012; Sharon et al., 2013; Vael y Desager, 2009) (Fig. 20).

La sucesión de comunidades microbianas en el TGI durante la infancia es un proceso tan complejo como desconocido. El aumento progresivo tanto en la concentración de microorganismos como en el número de especies conduce a un rápido enriquecimiento en la cantidad de genes funcionales de origen microbiano. Numerosos estudios centrados en la estructura de la

comunidad microbiana durante la infancia han apuntado a la introducción de alimentos sólidos como el momento de mayor impacto en el cambio del patrón microbiómico en los niños amamantados (Favier et al., 2002; Koenig et al., 2011). Sin embargo, un estudio muy reciente ha señalado que realmente el factor determinante en dicho cambio no es la introducción de nuevos alimentos, sino el momento en el que cesa la lactancia (Bäckhed et al., 2015). Así, estos investigadores encontraron más taxones característicos de adultos en el microbioma de los niños que se destetaron precozmente, mientras que el de los niños que recibieron lactancia materna durante más tiempo estaba dominado por bacterias presentes en la leche humana.

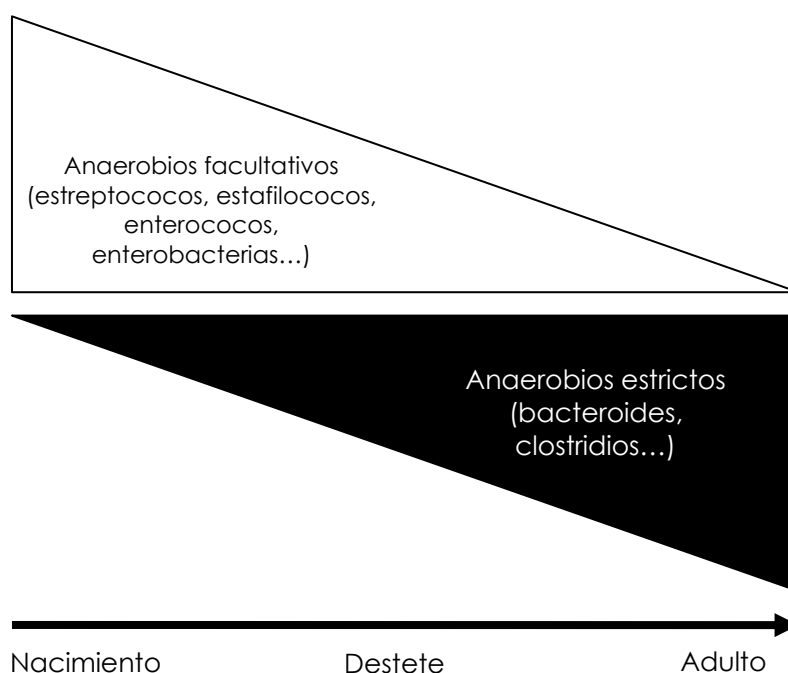


Figura 20. Ecología microbiana del intestino postnatal en mamíferos. Los anaerobios facultativos predominan en el intestino del neonato pero, tras el destete, empiezan a aumentar los anaerobios estrictos, que son predominantes en la comunidad estable que caracteriza al intestino del adulto.

En general, se estima que los grupos microbianos dominantes en la microbiota intestinal de los niños de 2-3 años son similares a los de los adultos, aunque todavía existen diferencias en cuanto a las especies presentes (Favier et al., 2002; Ottman et al., 2012; Scholtens et al., 2012; Yatsunenko et al., 2012). Hacia el final de la adolescencia se alcanza el clímax y, a partir de entonces, este ecosistema muestra una elevada estabilidad en adultos sanos (Franks et al., 1998; Zoetendal et al., 1998). En cualquier caso, la microbiota del TGI humano parece ser específica de cada individuo (Franks et al., 1998).

Existe un gran interés por conocer el desarrollo de la microbiota del intestino infantil y su influencia sobre el transcriptoma, el proteoma y el metaboloma del niño. Sin embargo, por el momento, los conocimientos firmes

sobre este tema son todavía relativamente escasos a pesar del elevado número de estudios que se han realizado hasta la fecha. Hay situaciones especiales, como es el caso de niños prematuros y/o expuestos a antibióticos de amplio espectro, de las que aún se tienen muy pocos conocimientos.

II. 2. 3. Funciones de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal ejerce papeles esenciales para la fisiología de su anfitrión a pesar de que todavía desconocemos parte de tales funciones y/o los mecanismos responsables de las mismas. Estas funciones no se limitan en absoluto al ámbito intestinal sino que abarcan también la interacción con las microbiotas existentes en otras mucosas y epitelios y prácticamente con la totalidad de sistemas y aparatos del organismo (McFall-Ngai et al., 2013) (Fig. 21). En este sentido, no es de extrañar que las disbiosis intestinales se estén relacionando, de una forma creciente, con un amplio abanico de enfermedades locales o sistémicas entre las que se incluyen la diabetes tipo 2, el síndrome de intestino irritable, las enfermedades inflamatorias intestinales, el cáncer de colon, el síndrome metabólico y la obesidad, la aterosclerosis, el lupus eritematoso, la endocarditis y diversos trastornos psíquicos como el autismo, la ansiedad y la depresión (Warinner et al., 2014). A continuación, se describirán brevemente algunas de las funciones particularmente relevantes durante la colonización inicial del intestino infantil (Tabla 9).

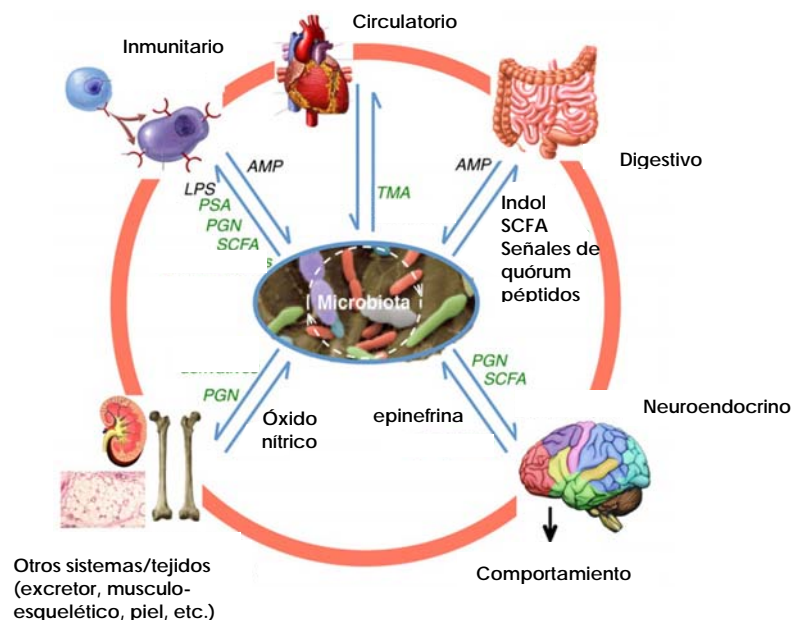


Figura 21. Señalización entre el hospedador y su microbiota. Los miembros de la microbiota se comunican entre ellos e intercambian señales con los distintos órganos y sistemas del hospedador, participando en su homeostasis. AMP, péptidos antimicrobianos; LPS, lipopolisacáridos; PGN, peptidoglicano; PSA, polisacárido A; SCFA, ácidos grasos de cadena corta; TMA, óxido de trimetilamina. Adaptado de McFall-Ngai (2013).

Tabla 9. Funciones de la microbiota intestinal^a.

Función	Efecto / mecanismo
Nutritiva	Síntesis de vitaminas Degradación de paredes celulares vegetales no digeribles por el TGI humano (producción de AGCC)
Protección	Contribución a la integridad de la barrera intestinal (AGCC) Exclusión competitiva de patógenos Producción de ácidos y/o sustancias antimicrobianas Degradación de sustancias xenobióticas
Regulación de la angiogénesis	Estimulación de la formación de microvasculatura
Regulación hormonal	Influencia en la homeostasis energética: modulación de leptina y ghrelina Metabolismo de estrógenos en el intestino
Inmunitaria	Contribuye a la homeostasis intestinal por estimulación del GALT Interviene en la defensa de las mucosas por: <ul style="list-style-type: none"> • Estimulación/inhibición de la producción de citoquinas • Contribución a la maduración del sistema inmunitario • Inducción de la producción de IgA en los ganglios linfáticos mesentéricos • Desarrollo de la tolerancia oral • Estimulación de células presentadoras de antígenos Colabora en el desarrollo de la tolerancia inmunitaria frente a bacterias comensales por: <ul style="list-style-type: none"> • Interacción con células epiteliales y dendríticas (receptores TLR) • Interacción con CD14

Fuente: ^aAdaptado de Domínguez-Bello y Blaser (2008).

En primer lugar, su función metabólica resulta obvia, no sólo por su acción metabólica directa sobre los componentes de la dieta sino también por la capacidad de regular la expresión de genes humanos implicados en el metabolismo de nutrientes (Hooper et al., 2002). Una de las principales funciones metabólicas de nuestra microbiota es la generación de nutrientes asimilables mediante la fermentación del mucus producido por el epitelio y de diversos compuestos que las células humanas no pueden digerir (oligosacáridos de la leche humana, celulosa, hemicelulosa, almidón resistente, pectinas...). El resultado final es la generación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente acetato, propionato y butirato, responsables de funciones muy importantes tanto al nivel intestinal, incluyendo la correcta diferenciación celular del epitelio intestinal y la absorción de iones como calcio, magnesio y hierro (Adlerberth y Wold, 2009; Guarner y Malagelada, 2003), como al sistémico (Guarner y Malagelada, 2003). No es de extrañar que la cuantificación de los AGCC (y, especialmente, del butirato) sea un marcador de la actividad metabólica de la microbiota intestinal. Recientemente, se ha observado que la microbiota de los niños con cólico del lactante se caracteriza por una menor cantidad de microorganismos

productores de butirato que la de los niños sanos (de Weerth et al., 2013). La microbiota también es capaz de aportar aminoácidos y proteínas y participa en la biosíntesis de vitaminas y en la detoxificación o eliminación de compuestos perjudiciales para la salud (Sanz et al., 2004). Globalmente, se considera que la actividad metabólica de nuestra microbiota es comparable a la del hígado (He, 2015; Shanahan, 2004).

En los últimos años se ha prestado gran atención a la posible relación entre la composición de la microbiota, el síndrome metabólico y la obesidad (Ley, 2010; Turnbaugh et al., 2006; Turnbaugh et al., 2009). La microbiota de individuos obesos se caracteriza por la disminución del ratio *Bacteroidetes/Firmicutes*, importante en la regulación del metabolismo energético y en la formación de los depósitos de grasa. Esta regulación está mediada por diversas señales, incluyendo los AGCC producidos por la microbiota que activan receptores que se expresan preferentemente en los adipocitos e intercambian señales con el hipotálamo y otras áreas del cerebro (He, 2015; Schéle et al., 2015). El butirato estimula la producción de leptina en los adipocitos e induce la secreción de diversos neuropéptidos relacionados con la modulación la ingesta y el metabolismo lipídico y de la glucosa (El Aidy et al., 2015; He, 2015).

Las poblaciones constituyentes de un ecosistema superpoblado, como es la microbiota intestinal, interactúan entre sí hasta alcanzar un estado de equilibrio en el que sus miembros tratan de evitar la incorporación de microorganismos transeúntes (diMauro et al., 2013). Entre los mecanismos de defensa destacan la competencia por los recursos disponibles y la producción de numerosos metabolitos resultantes de la interacción entre la microbiota y el hospedador (Vogt et al., 2015), incluyendo diversas sustancias antimicrobianas, tanto de origen procariota como eucariota.

Pese al desconocimiento exacto de los mecanismos que determinan el equilibrio simbiótico entre hospedador y microbiota, la interacción con los primeros colonizadores parece crucial en la maduración y modulación del sistema inmunitario del hospedador (Won y Rhee, 2015). En consecuencia, la adquisición de la microbiota intestinal es un factor fundamental para la maduración el sistema inmunitario innato y adquirido desde el nacimiento. En este sentido, los receptores de reconocimiento de patrones (PRR; del inglés, *Pattern Recognition Receptors*), como los receptores de tipo Toll (TLR; del inglés, *Toll-Like Receptors*) o de tipo Nod (NLR; del inglés, *Nod-Like Receptors*), específicos del sistema inmunitario innato y expresados por las células eucariotas, son capaces de reconocer motivos microbianos muy conservados (Abreu, 2010; Cario, 2005). Esta interacción provoca una cascada de señalización celular que conduce a las distintas respuestas celulares responsables de dirigir la respuesta inmunitaria adquirida. Obviamente, las respuestas son diferentes si se establece contacto con una bacteria patógena

que si se hace con una bacteria comensal, mutualista o probiótica (Weng y Walker, 2013).

Estas últimas bacterias también intervienen en la maduración de las células T helper (Th) y en su diferenciación a células Th1, Th2, Th17 y Treg, asegurando una respuesta de base celular adecuada para el mantenimiento de la homeostasis (Swiatczak y Rescigno, 2012; Walker, 2008) (Fig. 22). En condiciones fisiológicas, los fetos a término y los RN se caracterizan por una respuesta predominantemente de tipo Th2. Con la intensificación de la colonización postnatal, el sistema inmunitario equilibra esa situación al recibir un notable estímulo antigénico de tipo pro-Th1. Si por cualquier motivo (como una baja exposición a microorganismos), este cambio no se produce y prevalecen las respuestas Th2, aumentará notablemente el riesgo de padecer problemas alérgicos (Di Mauro et al., 2013).

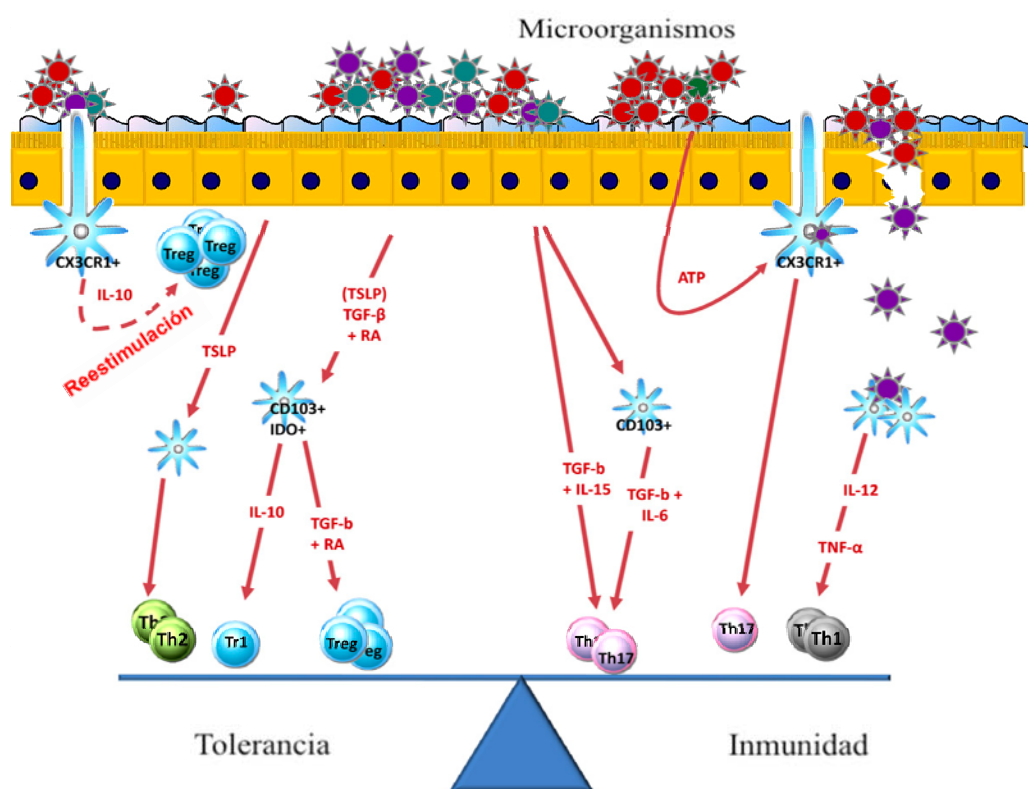


Figura 22. Acción integrada de los factores inmunitarios de la lámina propia intestinal. La microbiota del lumen determina la composición y la concentración de citoquinas, quimioquinas y otros factores en la lámina propia mediante la interacción directa con las células dendríticas (CD) y/o mediante la participación de receptores de reconocimiento de patrones en las células epiteliales intestinales (CEI). Las diferentes combinaciones y concentraciones de estos factores en los tejidos influyen en las funciones específicas de las CD. En particular, determinan conjuntamente si una CD promueve la diferenciación de las células T reguladoras (Treg), Th17, Th1 o Th2. Fuente: Adaptado de Swiatczak y Rescigno (2012).

Es importante señalar que una correcta interacción entre los microorganismos y el sistema inmunitario en las primeras etapas de la vida conduce al establecimiento de la tolerancia oral, situación caracterizada por una reducción de la respuesta inmunitaria frente a bacterias no patógenas y antígenos alimentarios mediante la activación de las células Treg (Borrue, 2003; Walker, 2008). Es más, la correcta adquisición de la microbiota al principio de la vida posee efectos inmunitarios funcionales a corto, medio y largo plazo, por lo que se trata de un condicionante de salud en la vida futura (Renz et al., 2012; Stockinger et al., 2011; Weng y Walker, 2013; White et al., 2013). De hecho, diversos autores sugieren la existencia de un periodo crítico (o ventana de tiempo) durante los primeros días de vida en el que se debe adquirir una microbiota "saludable" para reducir el riesgo de sufrir diversas enfermedades a lo largo de la vida (El Aidy et al., 2013; Fouhy et al., 2012; Renz et al., 2012; Sim et al., 2013). El equilibrio entre los procesos de tolerancia y de activación inmunológica depende de numerosos factores entre los que se incluyen el bagaje genético, el tipo y dosis del antígeno, la edad de la primera exposición, su frecuencia de administración, el estado inmunológico del hospedador o la vía de exposición.

Diversos estudios epidemiológicos y ensayos *in vivo* han mostrado que el patrón de colonización del intestino en las primeras etapas de la vida influye de manera relevante en el desarrollo postnatal del sistema nervioso central y este hecho puede tener consecuencias a largo plazo (Begega et al., 2010; Collins et al., 2012). La comunicación entre la microbiota y el sistema nervioso central se establece por diferentes vías que incluyen la inducción de la secreción de neuropéptidos en el intestino, la estimulación del nervio vago y de otros nervios o la señalización a través de mediadores inmunológicos (Fig. 23). Existe también una influencia indirecta mediada por los cambios en la motilidad, la permeabilidad y las secreciones intestinales. Además, datos recientes destacan la implicación de distintos productos del metabolismo bacteriano en el diálogo cerebro-intestinal (El Aidy et al., 2015; diMauro et al., 2013).

Los AGCC también parecen desempeñar un papel determinante en la comunicación y regulación de este eje (El Aidy et al., 2015; Schéle et al., 2015). Estas sustancias estimulan la motilidad del TGI y la producción de serotonina, importante neurotransmisor cuya deficiencia está directamente relacionada con los síntomas de depresión. Los productos bacterianos contactan con el epitelio intestinal estimulando las células enteroendocrinas del sistema nervioso entérico, capaces de producir neuropéptidos inhibitorios o excitadores que difunden en la lámina propia. El sistema nervioso entérico, cuya función es la regulación del flujo sanguíneo y de la motilidad gastrointestinal, requiere de la interacción con el sistema inmune y la microbiota para su correcto funcionamiento y el mantenimiento de la homeostasis (El Aidy et al., 2015).

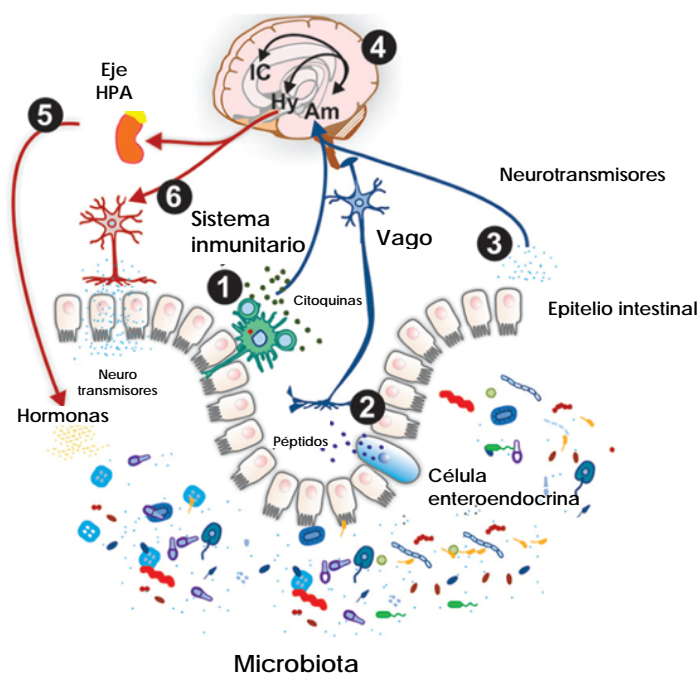


Figura 23. Eje microbiota-intestino-cerebro. Las interacciones bidireccionales entre la microbiota intestinal y el sistema nervioso central se establecen mediante vías endocrinas, inmunológicas y neuronales. En las rutas aferentes (flechas azules), los linfocitos pueden liberar citoquinas que pueden ejercer acciones endocrinas o paracrinas (1); las terminaciones nerviosas sensoriales, como en el nervio vago, se pueden activar por los péptidos intestinales liberados por las células enteroendocrinas (2); Los neurotransmisores (o sus precursores producidos como metabolitos microbianos) pueden alcanzar el epitelio intestinal ejerciendo acciones endocrinas o paracrinas (3); una red neuronal, que incluye a la amígdala (Am) y al córtex insular (IC), procesa las señales viscerales. Consecuentemente, el hipotálamo (Hy) se activa y se inicia la ruta eferente (flechas rojas) (4); los corticosteroides liberados como resultado de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales (HPA), modulan la composición de la microbiota intestinal (5). La activación neuronal eferente puede conducir al reflejo colinérgico antiinflamatorio y/o a la activación del sistema simpático, y ambos hechos liberan neurotransmisores que pueden afectar directamente a la composición de la microbiota intestinal. Adaptado de Montiel-Castro (2013).

II. 2. 4. Microbiota intestinal del niño prematuro

La microbiota de los RN sanos a término por parto vaginal sin medicación y alimentados exclusivamente con leche de la propia madre se considera como el prototipo de la microbiota ideal para esa edad (Penders et al., 2006). Sin embargo, este estándar de colonización bacteriana óptima se puede ver alterado por el tipo de parto, la dieta, el uso de antibióticos y/o el nacimiento prematuro (Adlerberth y Wold, 2009; Fanaro et al., 2003).

Como se ha comentado en apartados anteriores de esta introducción, los niños prematuros tienen una experiencia postnatal muy distinta, en general, que la de aquellos nacidos a término. Nacen tras rotura prematura o prolongada de membranas, suelen recibir antibióticos y otros medicamentos, están inmersos en un ambiente hospitalario durante periodos relativamente prolongados, tienen retrasado el comienzo de la alimentación enteral (y, cuando se inicia, puede ser distinta a la leche de la propia madre), poseen una barrera gástrica alterada y, con cierta frecuencia, sus madres sufren infecciones o disbiosis microbianas en la cavidad oral, TGI o en el ámbito genitourinario (Dial, 2009).

Por lo que respecta al intestino (y siempre en comparación con los niños nacidos a término), los niños prematuros muestran una menor capacidad de absorción de nutrientes, una barrera intestinal alterada y un sistema inmunitario mal regulado. En esta situación, el epitelio intestinal carece de varios de los mecanismos de protección y, en consecuencia, es mucho más susceptible a ser invadido por parte de algunos miembros de la microbiota; este hecho induce la producción de citoquinas proinflamatorias que, a su vez, comprometen aún más a los mecanismos de defensa intestinal. El desequilibrio entre la lesión de las células epiteliales y su reparación conduce a un círculo vicioso de mala digestión, invasión bacteriana, activación inmunológica e inflamación (Siggers et al., 2011) (Fig. 24).

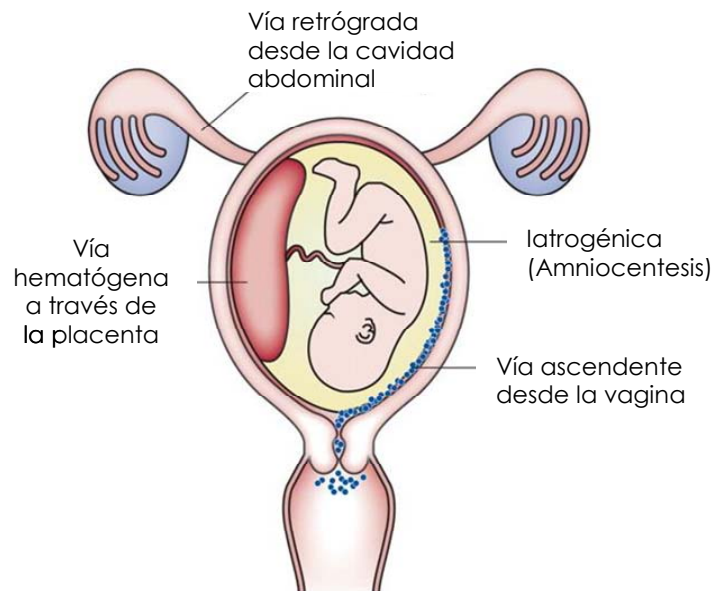


Figura 24. Posibles rutas de infección intrauterina.

Todos estos factores conducen a una alteración en el establecimiento de la microbiota intestinal, que se ha llegado a describir como aberrante. En general, estas alteraciones se caracterizan por un aumento en la prevalencia

de bacterias potencialmente patógenas, una alta variabilidad entre los individuos y una menor diversidad microbiana con respecto a los RN a término (Chang et al., 2011; Jacquot et al., 2011). La microbiota de los niños prematuros suele ser fluctuante y muestra una disminución de lactobacilos y de anaerobios estrictos, como *Bifidobacterium* y *Bacteroides*, y un aumento de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (Barrett et al., 2013; Jacquot et al., 2011; LaTuga et al., 2011; Magne et al., 2006; Penders et al., 2006; Rougé et al., 2010; Westerbeck et al., 2006). Al nivel de filo, la microbiota de estos niños está dominada por bacterias del filo *Proteobacteria* durante su primer mes de vida (Chang et al., 2011; Cilieborg et al., 2012; Jacquot et al., 2011; LaTuga et al., 2011; Madan et al., 2012; Mshvildadze et al., 2010; Mshvildadze et al., 2011; Siggers et al., 2010). La alteración en la composición de la microbiota conlleva cambios metabólicos en el hospedador y, de hecho, la concentración de AGCC es menor en las heces de los prematuros que en la de los RN a término (Arboleya et al., 2012; Favre et al., 2002; Szylit et al., 1998) (Fig. 25).

La evolución de la microbiota en la primera semana de vida se caracteriza por la dominancia de los géneros *Staphylococcus* y *Enterococcus* (Blakey et al., 1982; Gewolb et al., 1999; Jacquot et al., 2011; Magne et al., 2006; Rougé et al., 2009; Sakata et al., 1985). Estas poblaciones se mantienen a concentraciones relativamente altas y constantes durante, al menos, el primer mes de vida del prematuro. Hacia el cuarto día posparto, se empieza a detectar en heces la presencia de diversos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (fundamentalmente de los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Enterobacter*) y su concentración aumenta progresivamente a lo largo del primer mes (Blakey et al., 1982; Rotimi et al., 1985).

Durante ese mismo periodo, el aislamiento de especies de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* es muy infrecuente, aunque algunos autores apuntan a *Bifidobacterium* como el género anaerobio más frecuente tras la primera semana (Blakey et al., 1982; Butel et al., 2007; Gewolb et al., 1999; Rotimi et al., 1985; Sakata et al., 1985; Westerbeck et al., 2006). El empleo de técnicas independientes de cultivo permite detectar DNA perteneciente a especies de ambos géneros en un número mayor de muestras, aunque en un porcentaje claramente inferior al observado en niños nacidos a término (Rougé et al., 2009). En cualquier caso, se observa un aumento paulatino de la detección de secuencias de las familias *Bifidobacteriaceae*, *Comamonadaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Streptococcaceae* y, sobre todo, *Lactobacillaceae* en los primeros días de vida (Arboleya et al., 2015). Sin embargo, su frecuencia disminuye drásticamente hacia la primera semana, coincidiendo con el aumento de las familias *Enterobacteriaceae* y *Micrococcaceae*. La dominancia de las enterobacterias y la escasez de ciertos anaerobios estrictos, como los del género *Bacteroides*, se mantiene durante los tres primeros meses (Arboleya et al., 2015; Sakata et al., 1985). Otras anaerobios descritos en la microbiota del prematuro son *Clostridium* y

Veillonella. Estos géneros aparecen en concentraciones bajas después de la segunda y sexta semana de vida, respectivamente, y posteriormente sus concentraciones crecen de forma progresiva. En general, se considera que la colonización del niño prematuro con bacterias anaerobias estrictas sufre un retraso considerable con respecto a la pauta observada en niños nacidos a término (Arboleya et al., 2015; Blakey et al., 1982; Jacquot et al., 2011; Magne et al., 2006).

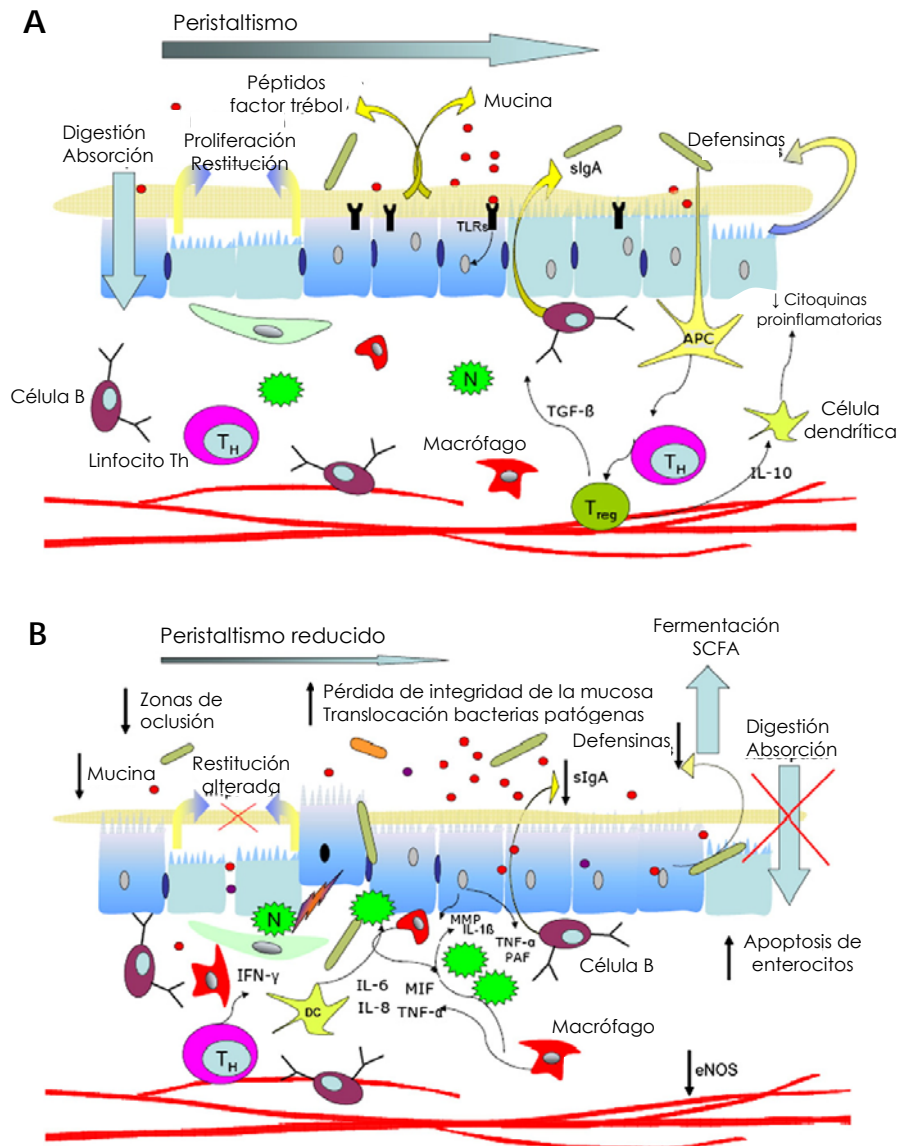


Figura 25. Comparación de la mucosa intestinal de niños nacidos a término (A) y de niños prematuros (B). SCFA, ácidos grasos de cadena corta; N, neutrófilos; IL, interleukinas; eNOS, óxido nítrico sintetasa del endotelio; TLR, receptor de tipo Toll; MMP, metaloproteína de la matriz.

La posible relación entre la presencia o ausencia de ciertos grupos microbianos y los datos clínicos o demográficos ha sido poco investigada hasta la fecha. Los escasos estudios existentes sugieren que la EG puede ser un parámetro determinante en la diversidad de la microbiota del prematuro, no habiéndose encontrado diferencias significativas en función del PN, la ruptura prematura de membranas, la antibioterapia materna o el sexo (Mshvildadze et al., 2010).

Las diferencias observadas en la microbiota de los niños nacidos a término dependiendo de que el nacimiento fuese por vía vaginal o por cesárea indican que el tipo de parto ejerce una influencia importante en la colonización inicial del neonato. A priori, lo mismo sería aplicable a los RN prematuros. Sin embargo, la gran mayoría de los estudios llevados a cabo en esta subpoblación no hacen referencia a este factor (Arboleya et al., 2015; Siggers et al., 2010). Entre los pocos estudios al respecto destaca uno realizado hace 30 años y que observaba un patrón de colonización más retardado en el caso de aquellos prematuros nacidos por cesárea (Rotimi et al., 1985) y otro muy reciente en el que se describe una mayor diversidad microbiana en los prematuros nacidos por cesárea, con una mayor presencia de los géneros *Negativococcus*, *Leuconostoc*, *Vagococcus* y *Butyrivibrio* (Ardissone et al., 2014).

Los antibióticos son el medicamento más frecuentemente administrado a los prematuros en las UCIN. En muchas ocasiones, se emplean de forma empírica para prevenir infecciones o para el tratamiento de posibles infecciones subclínicas, con la finalidad de anticiparse a acontecimientos que pueden poner en riesgo la vida del prematuro. Habitualmente se emplean mezclas de antibióticos de amplio espectro durante 2-3 días. El historial y evolución de cada RN puede prolongar su administración a 5 o más días. La antibioterapia empírica no está exenta de riesgos para la salud a corto y largo plazo, entre los que se incluyen el aumento de resistencias a antibióticos que pueden ser fundamentales en casos de sepsis, el aumento de infecciones fúngicas y por estafilococos coagulasa-negativos en las UCIN y, especialmente, la alteración del patrón de colonización en un periodo que resulta crítico para la maduración intestinal e inmunológica (Greenwood et al., 2014; Kuppala et al., 2012). Globalmente, el uso prolongado de antibióticos se ha asociado con la disminución de la diversidad microbiana, el aumento de la presencia de enterobacterias en las primeras semanas de vida, incluyendo clones de alto riesgo, y el retraso en la colonización por *Bifidobacterium* y *Bacteroides* (Arboleya et al., 2015; Greenwood et al., 2014). Las alteraciones causadas en la microbiota intestinal pueden predisponer al prematuro al desarrollo de algunas de las patologías más frecuentes y preocupantes en esta población, como la NEC y las sepsis (Kuppala et al., 2012; Madan et al., 2012; Wang et al., 2009). Por ese motivo, la antibioterapia empírica constituye actualmente una práctica controvertida, con defensores y detractores, pero

que debería ser reconsiderada en el contexto actual de la emergencia de bacterias resistentes a antibióticos y el compromiso que este hecho pueda suponer para la salud de las futuras generaciones.

El patrón de alimentación es otro de los factores determinantes en la adquisición y evolución de la microbiota infantil. En el caso de los prematuros más inmaduros, la imposibilidad de amamantarse directamente y/o la reducida producción de leche por parte de la madre durante los primeros días (Kuppala et al., 2012) hacen que sean necesarias estrategias de alimentación distintas o complementarias a la lactancia materna, como la nutrición parenteral o la enteral. En general, la nutrición parenteral prolongada provoca un retraso en el desarrollo normal del intestino y en la colonización bacteriana (Blakey et al., 1982), siendo un factor que aumenta el riesgo de sufrir NEC. Este hecho ha conducido al fomento de la introducción lo más temprana posible de la alimentación enteral.

Por otra parte, las superficies internas de las SNG con las que se suelen administrar los alimentos durante los primeros días son lugares donde las bacterias asociadas al ambiente hospitalario pueden formar grandes biopelículas y, en consecuencia, actúan como fuentes continuas de tales microorganismos para el RN (Hurrell et al., 2009). Por lo que respecta a la colonización con bifidobacterias, típicamente asociada a la lactancia materna, algunos trabajos sólo detectan su presencia en aquellos niños prematuros que reciben leche de su propia madre y que, a diferencia de la LMD, no ha sido pasteurizada previamente (Schwartz et al., 2003).

La escasez de estudios enfocados en la colonización de los niños prematuros en función de los alimentos que reciben puede deberse a la dificultad para establecer un patrón de alimentación claramente definido en esta población. Aunque el orden de preferencia para la alimentación de prematuros es, en primer lugar, la leche de la propia madre, seguida de la LMD y, finalmente, de las fórmulas infantiles, a menudo se observan alimentaciones mixtas con dos o tres tipos de alimentos, dependiendo de su disponibilidad en la UCIN.

Globalmente, la fuerte influencia del uso de antibióticos y del propio ambiente hospitalario parecen determinantes en la adquisición de la microbiota de los niños prematuros. De hecho, estos factores son tan potentes que parecen minimizar el papel desempeñado por otros que se consideran determinantes en el RN a término, como el tipo de nacimiento o la forma de alimentación. En consecuencia, se necesitan nuevas estrategias en el manejo de estos niños que favorezcan la normalización, lo más tempranamente posible, de su proceso de colonización intestinal.

II. 2. 5. Sepsis y NEC en el niño prematuro

El hecho de nacer prematuro aumenta el riesgo de padecer infecciones neonatales (Figura 26) (Lawn et al., 2010). Una sepsis neonatal es una infección, frecuentemente bacteriana, que ocurre en un RN de menos de 90 días desde su nacimiento. Las sepsis de aparición temprana se producen en la primera semana de vida, mientras que las de aparición tardía ocurren entre los días 7 y 90 posparto. La incidencia de las sepsis neonatales oscila entre 0,5 y 8 de cada 1.000 nacimientos vivos y es la causa más común de mortalidad neonatal en los países en desarrollo, representando entre el 30-50% del total de muertes neonatales cada año (Lawn et al., 2010).

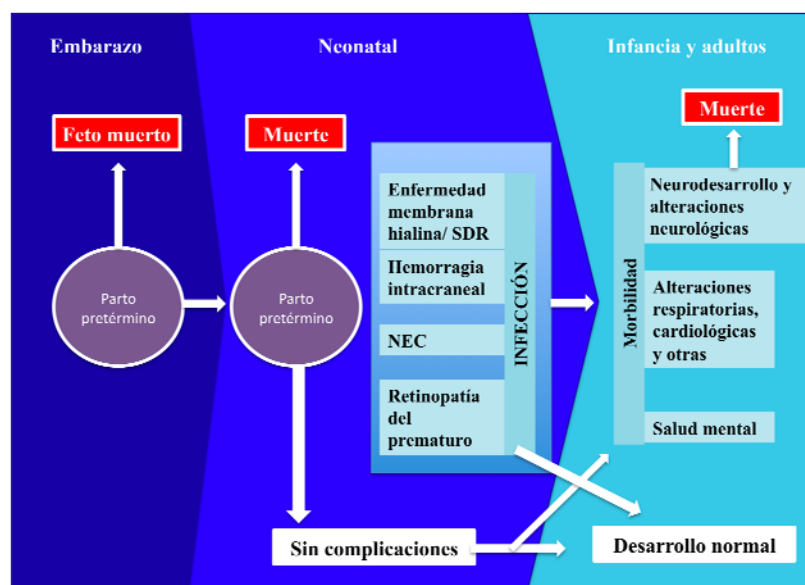


Figura 26. Papel central de las infecciones como causa de morbilidad y mortalidad en los niños prematuros. SDR: Síndrome de Distrés Respiratorio; NEC: Enterocolitis necrotizante. Fuente: Adaptado de Blencowe (2012a).

Las sepsis neonatales de aparición temprana son menos frecuentes que las tardías pero representan una complicación muy seria del RN prematuro y pueden cursar con bacteriemia, neumonía, meningitis e infecciones del tracto urinario. La tasa de mortalidad en prematuros de bajo PN con sepsis de aparición temprana es aproximadamente tres veces mayor que la de los niños de la misma EG que no padecen infección. Tradicionalmente se considera que, al menos gran parte de ellas, se originan por transmisión vertical entre la madre y el niño. Los principales agentes etiológicos son *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B) y *Escherichia coli* (Shah y Padbury, 2014; Simonsen et al., 2014). La incidencia de listeriosis neonatal es notablemente menor pero está asociada a tasas de morbilidad y mortalidad particularmente elevadas (Jiao et al., 2011). Las sepsis de aparición temprana, y especialmente aquellas que cursan con meningitis, están asociadas con una elevada incidencia de trastornos del neurodesarrollo, incluyendo parálisis

cerebral, y secuelas visuales y auditivas en los niños supervivientes (Blencowe et al., 2013; Shah y Padbury, 2014; Shane y Stoll, 2014; Simonsen et al., 2014; Stoll et al., 2004).

En contraste con las sepsis neonatales de aparición temprana, las de aparición tardía son más frecuentes, ocurriendo en aproximadamente un 20% de los prematuros de peso muy bajo, y suelen tener una naturaleza nosocomial. La mayoría de estas infecciones están causadas por bacterias Gram-positivas y, especialmente, por estafilococos coagulasa-negativos (particularmente *Staphylococcus epidermidis*), que tienen capacidad para formar biopelículas y que muestran multirresistencia a antibióticos (Hell et al., 2013; Marchant et al., 2013; Polin et al., 2012). No obstante, también pueden causar infecciones nosocomiales ciertas bacterias Gram-negativas (*Klebsiella* spp., *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. y otros) y algunas levaduras de los géneros *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*...) y *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* y otros) (Ali et al., 2012; Badiee et al., 2011; Peman et al., 2013; Shane y Stoll, 2014). Aunque los estafilococos coagulasa-negativos son responsables del mayor número de casos de sepsis nosocomiales, la gravedad de estos episodios suele ser menor que los causados por enterobacterias (Kuppala et al., 2012). En cualquier caso, el riesgo de infección es inversamente proporcional a la EG y al PN (Tabla 10).

La NEC, que suele afectar a niños prematuros alimentados con fórmula, entre la segunda y la tercera semana de vida, es una infección caracterizada por un daño variable en el TGI que oscila desde pequeñas lesiones en la mucosa hasta la necrosis con perforación (Chen et al., 2014). La NEC sigue constituyendo una gran preocupación para neonatólogos, gastroenterólogos y cirujanos debido a su elevada morbilidad y mortalidad, y a que, debido a su etiología multifactorial, no ha podido ser erradicada de las UCIN hasta la fecha (Schnabl et al., 2008). Recientes estudios microbiómicos sugieren que este problema no se origina como consecuencia de la aparición de un agente patógeno único sino que denota la existencia de procesos de disbiosis previos al desarrollo de la NEC, caracterizados por un dominio de las poblaciones de *Firmicutes* y/o *Proteobacteria* (en este último caso, básicamente miembros de la familia *Enterobacteriaceae*) (Berrington et al., 2014; Carlisle y Morowitz, 2013; Cilieborg et al., 2012; Morrow et al., 2013; Torrazza et al., 2013). Se trata de un abordaje sin duda prometedor para la identificación de biomarcadores y el desarrollo de nuevas estrategias de prevención y tratamiento basadas en la manipulación de la microbiota intestinal.

Tabla 10. Factores que predisponen al desarrollo de sepsis en el neonato.

Inmadurez del sistema inmunitario <ul style="list-style-type: none"> - Paso transplacentario reducido de IgG materna (pretérmino) - Inmadurez relativa de todos los mecanismos inmunológicos (fagocitosis, actividad del complemento, función de linfocitos T, etc.)
Exposición a microorganismos del tracto genital materno <ul style="list-style-type: none"> - Infección amniótica por vía ascendente - Contacto con microorganismos durante el parto - Parto prematuro desencadenado por infección (corioamnionitis)
Factores periparto <ul style="list-style-type: none"> - Traumatismos de piel, vasos, etc., durante el parto - <i>Scalp</i> de cuero cabelludo por electrodos u otros procedimientos
Procedimientos invasivos en UCIN <ul style="list-style-type: none"> - Intubación endotraqueal prolongada - Colocación de catéteres intravasculares - Alimentación intravenosa - Drenajes pleurales - <i>Shunts</i> de líquido cefalorraquídeo
Incremento de la exposición postnatal <ul style="list-style-type: none"> - Presencia de otros neonatos colonizados - Hospitalización prolongada - Plétora hospitalaria - Escasez de personal sanitario (sobrecarga de trabajo)
Defensas de superficie alteradas <ul style="list-style-type: none"> - Piel fina, fácilmente erosionable
Presión antibiótica <ul style="list-style-type: none"> - Aparición de microorganismos resistentes - Infección fúngica

Finalmente, conviene señalar que los microorganismos cuya prevalencia es típicamente elevada tanto en el intestino del prematuro como en el ambiente hospitalario (*Klebsiella* spp., *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. agalactiae*, estreptococos del grupo *viridans*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *C. albicans* y otras levaduras) pueden originar consorcios polimicrobianos complejos (Mai et al., 2011; Normann et al., 2013; Schwiertz et al., 2003), con potencial para formar biopelículas y para intercambiar genes que confieren virulencia o resistencia a antibióticos (Beaussart et al., 2013; Logan et al., 2013; Macnow et al., 2013; Otto et al., 2013). Un mejor conocimiento de estas interrelaciones también facilitaría el desarrollo de nuevas herramientas para el control de las infecciones en las UCIN.

II. 2. 6. Modulación de la microbiota intestinal de los prematuros mediante el empleo de probióticos

En los últimos años, el campo de los probióticos ha experimentado un gran auge, lográndose avances científicos y clínicos que han permitido el desarrollo y comercialización de diversos productos debidamente contrastados. Paralelamente, también ha aumentado la demanda de probióticos por parte de unos consumidores cada vez más conscientes de la estrecha relación entre nuestra microbiota y la salud. Desafortunadamente, algunas compañías han aprovechado esta coyuntura para aplicar el término “probiótico” a productos que no encajan en este concepto y/o cuyos presuntos beneficios carecen de cualquier base científica. Este mal uso, intencionado o no, se ha visto favorecido por la ausencia, hasta principios del siglo XXI, de un consenso internacional sobre la metodología para evaluar la eficacia y seguridad de estos productos.

En 2001, una comisión de expertos convocados de forma conjunta por la FAO y la OMS reconoció la necesidad de establecer directrices para la evaluación de la eficacia y seguridad de los probióticos (FAO/OMS, 2001). La comisión propuso una definición de probiótico que, desde entonces, ha sido la más ampliamente aceptada en todo el mundo: *“microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del hospedador”*. En 2002, y recogiendo el guante de la comisión, un grupo de trabajo mixto de la FAO y la OMS elaboró unas directrices con los requerimientos mínimos necesarios para que a un producto se le pudiera otorgar el apelativo de probiótico (FAO/OMS, 2002) (Fig. 27). Los documentos derivados del trabajo de ambas comisiones, junto con las actualizaciones recogidas en los consensos de la Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos (SEPyP) (Guarner et al., 2010) y de la *Internacional Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISAPP) (Hill et al., 2014) son referencias clave para saber qué se entiende por probiótico en la actualidad. En 2004, el Comité de Nutrición de la ESPGHAN reconoció que existen evidencias concluyentes sobre el efecto beneficioso que algunos probióticos ejercen sobre la salud infantil, por lo que recomendó intensificar los esfuerzos para evaluar la eficacia de bacterias probióticas (Agostoni et al., 2004).

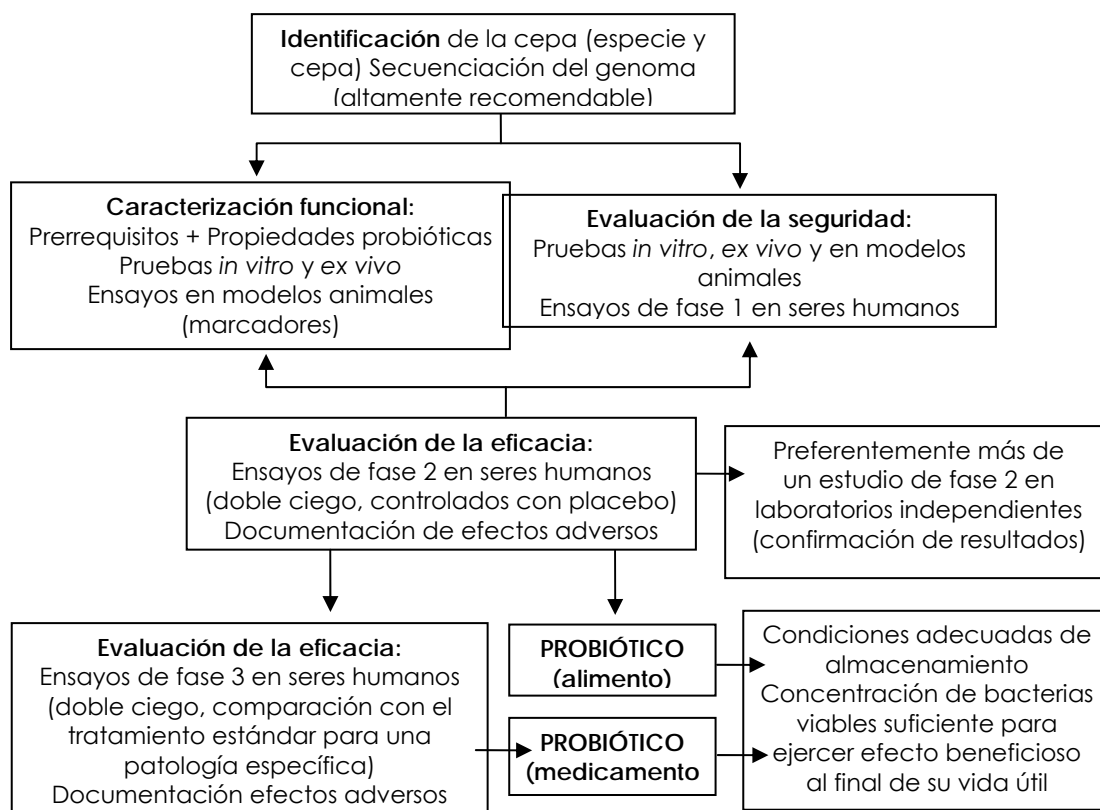


Figura 27. Directrices de la FAO/OMS para la evaluación de probióticos. Fuente: Rodríguez (2015).

El proceso que va desde la selección inicial de cepas hasta la comercialización de un probiótico eficaz para una diana específica no resulta sencillo. Tiene que contemplar diversos aspectos (científicos, clínicos, tecnológicos, normativos, económicos, comunicativos...) que, aunque en ocasiones no son fáciles de conjugar, pueden y deben ser compatibles entre sí. De los miles de cepas aisladas cada año por su presunto potencial probiótico en los laboratorios de todo el mundo, muy pocas pasan a una fase de desarrollo industrial y muchas menos aún son las que consiguen un hueco en los estantes de una farmacia o establecimiento alimentario. Los principales aspectos que se deben tener en cuenta en el camino que debe seguir una cepa desde su aislamiento inicial hasta su comercialización han sido revisados recientemente (Rodríguez, 2014).

Los microorganismos utilizados como probióticos incluyen a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y, especialmente, a bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque algunas formulaciones pueden incluir algunas cepas de *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus* y *Escherichia*. El uso preferencial de lactobacilos y bifidobacterias se debe, por una parte, a que se les considera avirulentos y, de

hecho, muchas especies gozan del estatus GRAS (*Generally Recognized as Safe*) de la *Food and Drug Administration* (FDA) estadounidense y QPS (*Qualified Presumption of Safety*) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA; del inglés, *European Food Safety Authority*); por otra, a que son los organismos que más se han empleado en las pruebas de aptitud probiótica y, en consecuencia, sus propiedades beneficiosas están más contrastadas (EFSA, 2013). La lista QPS se revisa anualmente, incorporando nuevas unidades taxonómicas si los datos disponibles así lo avalan. En consecuencia, es probable que en el futuro se incluyan géneros y especies (*Roseburia* spp., *Faecalibacterium prausnitzii*...) que no se han empleado hasta la fecha como probióticos pero a las que los estudios sobre el microbioma humano están vinculando con claros efectos beneficiosos para la salud (Hill et al., 2014).

Ahora bien, los organismos probióticos se emplean en un abanico muy amplio de situaciones, que incluye individuos sanos, personas sanas pero en una situación especial (bebés, mujeres embarazadas o lactantes, ancianos...) y otras con patologías de distintos tipos y severidades. En consecuencia, la evaluación de la seguridad debe tener en cuenta, entre otros factores, el microorganismo en cuestión, la forma de administración, el nivel de exposición, el estado de salud del hospedador y las funciones fisiológicas que puede desempeñar en el mismo (Sanders et al., 2010). En cualquier caso, el estudio, uso y demanda de los probióticos ha experimentado un rápido crecimiento en las últimas décadas, incluso para su administración a poblaciones de alto riesgo como es el caso de los prematuros. La heterogeneidad de los ensayos clínicos realizados dificulta alcanzar un consenso sobre las cepas más adecuadas y pautas de terapia claras. A pesar de ello su eficacia en la prevención y tratamiento de algunas enfermedades es evidente (Versalovic, 2013; Walker y Lawley, 2013).

El fundamento para el uso de probióticos en prematuros se basa en el papel clave que juega la colonización inicial del intestino neonatal en la patogenia de la NEC y de las sepsis. Entre los beneficios de la probioticoterapia en esta población se incluyen la mejora de la barrera intestinal, el aumento de la producción de IgAs y citoquinas antiinflamatorias, el aumento de la diversidad y funcionalidad de la microbiota y la disminución de la translocación bacteriana patológica (Chassard et al., 2014; Chen y Walter, 2013; Díaz, 2015; Hardy et al., 2013; Hemarajata y Versalovic, 2013; Rauch y Lynch, 2012; Sanders et al., 2010; Shlomai et al., 2014).

Los resultados de una reciente revisión sistemática y meta-análisis de 20 ensayos controlados aleatorizados (tamaño total de la muestra = 3816) confirman que la administración de probióticos a prematuros de muy bajo PN reduce significativamente el riesgo de NEC y la mortalidad por cualquier causa y carece de efectos adversos significativos (Wang et al., 2012). Los expertos coinciden en que los probióticos reducen el riesgo de NEC y la muerte, y la

evidencia para la reducción de la mortalidad es, como mínimo, tan contundente como la observada para otras intervenciones bien establecidas, como el empleo de corticosteroides o de surfactante (Alfaleh et al., 2011; Barrington, 2011; Shlomai et al., 2014; Tarnow-Mordi et al., 2010). De hecho, los probióticos muestran el mejor efecto para la prevención de NEC (RR: 0,33; IC 95%: 0,24-0,46; $p < 0,00001$) cuando se comparan con las 25 estrategias primarias que, según la base de datos Cochrane, se han incorporado a la práctica clínica en las UCINs. Entre estas 25 estrategias, únicamente cuatro han mostrado ser eficaces para reducir la mortalidad de los prematuros y, en comparación con ellas, la aplicación de probióticos es nuevamente la que tiene un mayor impacto positivo (RR: 0,56; IC 95%: 0,43-0,73; $p < 0,0001$) (Wang et al., 2012).

La profilaxis primaria implica exponer una gran población a una intervención para la prevención de una enfermedad en sólo una parte de los individuos tratados. Por tanto, resulta crucial demostrar que la intervención es muy segura, lo cual es particularmente relevante cuando la población a la que se dirige la profilaxis está constituida por niños prematuros. Los posibles efectos adversos de los probióticos incluyen las sepsis por las propias bacterias probióticas, la diseminación de resistencias a los antibióticos (en caso de que las cepas empleadas contengan genes de resistencia transmisibles) y la alteración de las respuestas inmunitarias a largo plazo. En este sentido, una revisión del nivel de evidencia de los probióticos en neonatos prematuros concluyó que, hasta el momento, no hay efectos secundarios dignos de consideración y que los resultados sobre seguridad a largo plazo son tranquilizadores. Algunos expertos argumentan que, aunque se produjera una sepsis por probióticos, se trata de una infección fácil de tratar y que es preferible una infección por un lactobacilo que aquellas producidas por patógenos como *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp. o ciertas levaduras (Kliegman, 2005).

El uso rutinario de una intervención en la práctica clínica permite evaluar sus efectos adversos de una forma mucho más relevante que durante un ensayo clínico. En este sentido, se ha observado que la administración de un probiótico a 1.130 RN prematuros (24-31 semanas de gestación) redujo el riesgo de NEC, sepsis de aparición tardía, muerte y sangrado rectal sin ningún efecto adverso remarcable (Bonsante et al., 2013). Otros muchos estudios que han evaluado el empleo de probióticos en la práctica rutinaria han llegado a las mismas conclusiones sobre su seguridad (Chou et al., 2010; Hunter et al., 2012; Romeo et al., 2011; Rougé et al., 2009; Sari et al., 2012), incluso cuando se suministraron a niños nacidos prematuros durante un periodo de entre 6 y 12 años (Luoto et al., 2010; Manzoni et al., 2011). Finalmente, muchas UCIN de nivel III en países como Japón, Italia, Finlandia o Colombia han estado utilizando probióticos rutinariamente durante más de 15 años y tampoco han notificado efectos adversos significativos (Deshpande et al., 2011) (Tabla 11).

Los resultados de diversos ensayos clínicos aleatorizados y de estudios observacionales han confirmado la seguridad y eficacia de los probióticos en los neonatos extremadamente prematuros que son, precisamente, los que tienen un mayor riesgo de sufrir NEC e intolerancia alimentaria y de morir (Narbona et al., 2014). Algunos investigadores han expresado su preocupación de que *"la microbiota de un recién nacido prematuro, sin una microbiota intestinal estable, puede ser sesgada de manera significativa por la colonización intencional con miles de millones de unos pocos organismos probióticos"* (Claud, 2011). Sin embargo, para la mayoría de los expertos la introducción de miles de millones de microorganismos probióticos, cuyo sesgo es el de hacer que la microbiota sea más estable y diversa y potencialmente menos patógena supone un verdadero alivio. En este sentido, la adopción de la opinión de los puristas de esperar hasta que se entiendan completamente los mecanismos responsables de los beneficios de los probióticos ni es realista y ni está justificada a la vista de las pruebas disponibles, existiendo una opinión creciente en torno a que el nivel de exigencia que se ha pedido a los probióticos para su uso en prematuros ha sido desproporcionadamente alto en comparación con el exigido a otras estrategias preventivas que han mostrado menor eficacia en la práctica (Shlomei et al., 2014).

De hecho, a pesar de la abrumadora evidencia científica, todavía existe cierta reticencia a la adopción de la profilaxis con probióticos, para reducir el riesgo de NEC y muerte, por buena parte del personal médico responsable del manejo de los prematuros (Janvier et al., 2013). Esta desconfianza se puede deber a la falta de unificación de criterios sobre las cepas más efectivas y las dosis o la duración más adecuadas del tratamiento. Sin embargo, la valoración del actual conocimiento sobre riesgos y beneficios de la administración o no de probióticos en esta población, debería ser suficiente para no retrasar más su incorporación en las UCIN (Sanders 2010, Shlomei 2014).

Tabla 11. Características de los estudios probióticos llevados a cabo en prematuros.

Población	Especies (cepa)	Dosis	Tratamiento	Estudio	Beneficios	EA	Referencia
<1500 g	B. infantis, S. thermophilus, B. bifidum	10 ⁹	D; desde NE hasta 36 EG corregida	C, P/C	<NEC <M, NS	-	Bin-Nun et al., 2005
<1500 g	L. acidophilus, B. infantis	10 ⁹ /kg	2X D	R, DC, P/C	<NEC, LOS, M	-	Lin et al., 2005
>1500 g	L. reuteri	10 ⁸	D	R, P/C	>TA, MI	-	Indrio et al., 2008
>1000 g <32 EG	L. rhamnosus GG	10 ⁹	D; 42 días	R, DC, P/C	<AB, NS	-	Chrzanowska-Liszewska et al., 2012
<1500 g	B. breve YIT4010	10 ⁹	D; desde NE hasta 7 días	R, P/C	>TA, C <G	-	Kitajima et al., 1997
<1500 g <33 EG	L. rhamnosus GG	10 ⁹	D; 7 días	DC, P/C	<NEC, IU, NS	-	Dani et al., 2002
28-32 EG	S. boulardii	-	D; 30 días	R, P/C	<En >B	-	Costalos et al., 2003
<1500 g	L. rhamnosus GG	10 ⁹	D; 6 semanas	R, DC, P/C	<Lev	-	Manzoni et al., 2006
<1500 g y <34 EG	B. lactis Bb12	10 ⁹	D; 21 días	R, DC, P/C	<En, CI >B	-	Mohan et al., 2006
<1500 g y <34 EG	B. lactis	10 ⁷	-	R, P/C	>CC <P	-	Stratiki et al., 2007
<1500 g y <34 EG	L. acidophilus, B. infantis	-	2X D; 6 semanas	R, P/C	<NEC, M	-	Lin et al., 2008
>1000 g y <32 EG	B. longum BB536, L. rhamnosus GG	10 ⁸	4X D; desde NE hasta el alta	R, DC, P/C	>TA	-	Rougé et al., 2009
<1500 g y <30 EG	B. lactis	10 ⁹	D; 6 semanas	R, P/C	<NEC, NS	-	Mihatsch et al., 2010
<1500 g	L. casei, B. breve	10 ⁹	D	R, DC, P/C	<NEC >MI	-	Braga et al., 2011
<1500 g	B. coagulans	10 ⁸	D; desde NE hasta el alta	R, DC, P/C	>TA	-	Sari et al., 2011
<1500 g	L. reuteri DSM 17938	10 ⁸	D; desde NE hasta el alta	R, DC, P/C	<NEC, Ne, H >TA, NS	-	Rojas et al., 2012
<32 EG	L. rhamnosus Lcr35	10 ⁸	2X D; 36 semanas	Re	<NEC, M >TA	-	Bonsante et al., 2013
<1300 g <29 EG	B. breve PS12929, L. salivarius PS12934	10 ⁹	2X D; desde NE y durante 28 días	DC	>Lb, B, IL 8, Cit AI <CP	-	Moles et al., 2015

EA: efectos adversos;

Tratamiento: NE: Nutrición Enteral; EG: Edad Gestacional; D: Diario; 2X D: 2 tomas diarias; 4X D: 4 tomas diarias

Estudio: C: Ciego; DC: Doble Ciego; R: Aleatorizado; P/C: Placebo/ Control; Re: Retrospectivo

Beneficios: NEC: Enterocolitis Necrotizante; M: Mortalidad; NS: No Significativo; LOS: Sepsis tardía; TA: Tolerancia Alimentaria; MI: Motilidad Intestinal; AB: Antibioterapia; C: Crecimiento; G: Gas intestinal; IU: Infección Urinaria; En: Enterobacterias; B: Bifidobacterium; Lev: Levaduras; CI: Clostridium; CC: Circunferencia Craneal; P: Permeabilidad intestinal; Ne: Neumonía; H: Hospitalización; Lb: Lactobacillus; IL 8: Interleuquina 8; Cit AI: Citoquinas Antiinflamatorias; CP: Calprotectina

Fuente: Adaptación Wang (2012)

III. Diversidad bacteriana en el meconio de recién nacidos prematuros y evolución de la microbiota fecal durante el primer mes de vida



III. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life

Artículo Publicado en "PLOS ONE"

Bacterial Diversity in Meconium of Preterm Neonates and Evolution of Their Fecal Microbiota during the First Month of Life

Laura Moles¹*, Marta Gómez¹, Hans Heilig², Gerardo Bustos³, Susana Fuentes², Willem de Vos^{2,4}, Leónides Fernández¹, Juan M. Rodríguez¹, Esther Jiménez^{1*}

1 Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, **2** Laboratory of Microbiology, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, **3** Servicio de Neonatología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain, **4** Department of Bacteriology and Immunology, University of Helsinki, Helsinki, Finland

Abstract

The establishment and succession of bacterial communities in infants may have a profound impact in their health, but information about the composition of meconium microbiota and its evolution in hospitalized preterm infants is scarce. In this context, the objective of this work was to characterize the microbiota of meconium and fecal samples obtained during the first 3 weeks of life from 14 donors using culture and molecular techniques, including DGGE and the Human Intestinal Tract Chip (HITChip) analysis of 16S rRNA amplicons. Culture techniques offer a quantification of cultivable bacteria and allow further study of the isolate, while molecular techniques provide deeper information on bacterial diversity. Culture and HITChip results were very similar but the former showed lower sensitivity. Inter-individual differences were detected in the microbiota profiles although the meconium microbiota was peculiar and distinct from that of fecal samples. *Bacilli* and other *Firmicutes* were the main bacteria groups detected in meconium while *Proteobacteria* dominated in the fecal samples. Culture technique showed that *Staphylococcus* predominated in meconium and that *Enterococcus*, together with Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*, was more abundant in fecal samples. In addition, HITChip results showed the prevalence of bacteria related to *Lactobacillus plantarum* and *Streptococcus mitis* in meconium samples whereas those related to *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Yersinia* predominated in the 3rd week feces. This study highlights that spontaneously-released meconium of preterm neonates contains a specific microbiota that differs from that of feces obtained after the first week of life. Our findings indicate that the presence of *Serratia* was strongly associated with a higher degree of immaturity and other hospital-related parameters, including antibiotherapy and mechanical ventilation.

Citation: Moles L, Gómez M, Heilig H, Bustos G, Fuentes S, et al. (2013) Bacterial Diversity in Meconium of Preterm Neonates and Evolution of Their Fecal Microbiota during the First Month of Life. PLoS ONE 8(6): e66986. doi:10.1371/journal.pone.0066986

Editor: Yolanda Sanz, Institute of Agrochemistry and Food Technology, Spain

Received: December 5, 2012; **Accepted:** April 27, 2013; **Published:** June 28, 2013

Copyright: © 2013 Moles et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the projects CSD2007-00063 (FUN-C-FOOD, Consolider-Ingenio 2010) and AGL2010-15420 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain), by the project FIS P509/00040 (Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain) and the unrestricted Spinoza Award to WMDv of the Netherlands Foundation for Scientific Research. EJ was granted with a FEMS Research Fellowship to perform HITChip analyses. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: esjimene@vet.ucm.es

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

The microbial colonization of the infant gastrointestinal tract is an essential process in the human lifecycle since interactions established between the microbiota and the host have important consequences for human health and disease [1]. Therefore, acquisition and diversity of the gut microbiota in term neonates have been the subject of several studies [2,3,4,5,6,7]. Different factors, such as mode of delivery, antibiotherapy, diet or environment, affect infant gut colonization [8,9] although their actual contribution to shape the infant microbiota remains unclear. In addition, gestational age and weight at birth also exert a strong influence on this process. Previous studies monitoring the bacterial communities in preterm infants indicated that the fecal microbiota of premature infants is different compared with that of term infants [10,11,12,13,14,15,16,17]. In fact, the gut coloniza-

tion pattern of preterm infants has been described as delayed and aberrant [18]. Abnormal intestinal colonization during the first weeks of life may alter the barrier, nutritional and immunological functions of the host microbiota [19,20] and, as a consequence, increases susceptibility to disease [21,22]. Recently, a study on the bacterial diversity of meconium in six preterm infants showed an association between low bacterial diversity in meconium and high risk to develop sepsis [23]. In general, studies on the gut microbiota of preterm and term infants have been focused on feces; in contrast, information on the change of bacterial composition from meconium to feces during the first weeks of life is scarce, particularly in relation to preterm babies [12,14]. Traditionally, it has been considered that the intestinal tract was sterile at birth, being rapidly colonized with microorganisms from the mother and the surrounding environment. However, some studies suggest that, actually, the meconium from healthy hosts is

not sterile and that gut colonization may start before birth [4,14,24,25,26,27,28]. Therefore, studies on the bacterial diversity of meconium may provide new clues on the initial gut colonizers and their potential role in infant health and disease. In a previous work of our group [27] the microbial composition of meconium samples from term healthy babies born at the Hospital Universitario 12 de Octubre was studied by culture methods. Identification of isolates from different growth media revealed that enterococci were the predominant genera followed by staphylococci, *Escherichia coli* and *Enterobacter* spp. This microbiota was substituted by obligate anaerobes, such as bifidobacteria, that became predominant during the first week of life (unpublished data). In this context, the objective of this work was to analyze bacterial diversity in meconium and feces of preterm infants during their first month of life. For this purpose culture-dependent and culture-independent methods were used since they often provide complementary views on the microbial diversity of biological samples.

Materials and Methods

Patients and Sampling

The prospective study included 14 preterm babies born at the Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid (Spain) (Table 1). Written informed parental consent was obtained for each preterm before inclusion. To be eligible for enrolment, preterms must have been born at a gestational age ≤ 32 weeks and/or with birth weight $\leq 1,200$ g, and without malformations or metabolic diseases. Relevant clinical data recorded for each infant, such as length of antibiotherapy, parenteral nutrition, nasogastric feeding, mechanical ventilation, hospital stay and type of feeding, are described in Table 2. All infants were fed with human milk (donor milk and/or their own mother's milk) and, occasionally, with preterm formula.

First spontaneously evacuated meconium and fecal samples were collected by the medical staff of the Department of Neonatology of the hospital. Fecal samples were collected weekly from the diapers of the infants during their stay at the neonatal intensive care unit (NICU). All the samples were stored at -20°C

until analysis. A non-used diaper was placed inside one of the incubators to be used as a control.

Ethics Statement

The Ethical Committee on Clinical Research of the Hospital Clínico San Carlos of Madrid approved all study protocols (10/017-E). Samples and clinical information were obtained after informed, written consent by the study infants' legal guardians.

Culture Analysis of the Samples

Adequate dilutions of meconium and stool samples were spread onto Man, Rogosa and Sharpe (MRS; Oxoid, Basingstoke, UK) and MRS supplemented with L-cysteine (0.5 g/L) (Sigma, St. Louis, USA) (MRScys) for isolation of lactic acid bacteria, MacConkey (MCK; BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) for isolation of *Enterobacteriaceae*, Baird Parker (BP, BioMérieux) for isolation of staphylococci, Sabouraud Dextrose Chloramphenicol (SDC, BioMérieux) for isolation of yeasts, and Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid), Wilkins-Chalgren (WC, Oxoid) and Columbia Nalidixic Acid Agar (CNA, BioMérieux) as general media for isolation of other bacterial groups. Plates were aerobically incubated at 37°C for up to 48 h, with the exception of SDC plates, which were incubated at 32°C for 96 h, and WC and MRScys plates that were anaerobically incubated (85% nitrogen, 10% hydrogen, 5% carbon dioxide) in an anaerobic workstation (Mini-MACS Don Whitley Scientific Limited, Shipley, UK) at 37°C for 48 h. Bacterial counts were recorded as the colony forming units (CFU)/g of meconium or feces and transformed to \log_{10} values before statistical analysis.

Bacterial Genotyping and Identification

After bacterial counting, approximately 670 isolates were selected, including at least one representative of each colony morphology type. These isolates were grown in BHI or MRS broth and stored at -80°C in the presence of glycerol (30%, v/v). Isolates were analyzed by optical microscopy to determine cell morphology and Gram-staining reaction, and tested for oxidase, catalase and coagulase activities. Subsequently, they were submitted to Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) polymer-

Table 1. Demographic data for the infant cohort.

Infant	Gestational age (week)	Delivery mode	Gender	Birth weight (g)	Sample collection (day of life)
1	31	Vaginal	Male	2,190	0, 7, 14, 21
2	30	Cesarean section	Male	1,550	0, 7, 14, 21
3	27	Cesarean section	Female	1,080	0, 7, 14, 21
4	30	Cesarean section	Male	2,030	0, 7, 14, 21
5	30	Vaginal	Male	1,760	0, 7, 14, 21
6	24	Cesarean section	Female	600	0, 14, 21
7	27	Vaginal	Male	1,540	0, 7, 14, 21
8	26	Cesarean section	Female	790	0, 7, 14, 21
9	32	Vaginal	Female	1,310	0, 7, 14, 21
10	26	Vaginal	Female	920	0, 7, 14, 21
11	29	Cesarean section	Female	1,040	0, 7, 14, 21
12	31	Vaginal	Female	1,430	0, 7, 14, 21
13	24	Cesarean section	Female	750	0, 7, 21
14	27	Vaginal	Female	1,040	0, 14, 21

doi:10.1371/journal.pone.0066986.t001

Table 2. Clinical characteristics of the preterm infants recruited in this study.

Infant	Hospital stay (days)	Antibiotherapy (days)	Mechanical ventilation (days)	Parenteral nutrition (days)	Nasogastric feeding tube (days)
1	26	3	0	3	18
2	42	3	0	5	38
3	60	4	0.5	3	48
4	27	3	2	0	26
5	27	0	0	0	26
6	113	5	9	8	107
7	68	4	2	5	58
8	84	7	0.5	6	70
9	28	3	0	0	21
10	102	15	26	8	97
11	47	2	0	5	45
12	37	3	0	4	35
13	92	8	1	14	83
14	68	7	0	7	62
Mean (95% CI)	58.64 (41.35; 75.93)	3.5 (3.0–7.0)*	0.25 (0.00–1.75)*	4.85 (2.66; 7.05)	52.40 (36.03; 68.82)

*Median (IQR).

doi:10.1371/journal.pone.0066986.t002

ase chain reaction (PCR) analysis to discard duplicate isolates from the same sample. RAPD profiles were obtained using primer OPL5 (5'-ACGCAGGCAC-3') [29]. Computer assisted analysis was performed with InfoQuest FP software (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Cluster analysis of RAPD pattern profiles was performed using the UPGMA method based on the Dice similarity coefficient.

Those isolates that displayed identical RAPD profile and had been obtained from the same sample were identified by species-specific PCR or 16S rRNA PCR sequencing. Initially, the isolates that, on the basis of preliminary tests, seemed to belong to the Genus *Staphylococcus* were identified as *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* or *Staphylococcus hominis* by a multiplex PCR method based on the *dnaJ* genes with primers J-StGen (5'-TGGCCAAAAGAGACTATTATGA-3'), J-StEpi (5'-CCACCAAAGCCTTGACTT-3'), J-StAur (5'-GGATCTCTTTGTCTGCCG-3') and J-StHom (5'-TTGACCACTACCCTCACAC-3') [30].

On the other hand, most of the isolates that seemed to belong to the Genus *Enterococcus* were identified by PCR species-specific detection of enterococcal *ddl* genes, which encode D-alanine: D-alanine ligases, following the protocol described by Dutka-Malen et al. [31]. For this purpose, four primers were used: E1 (5'-TCAAGTACAGTTAGTCTT-3'), E2 (5'-ACGATTCAAAGC-TAACTG-3'), F1 (5'-GCAAGGCTTCTTAGAGA-3') and F2 (5'-CATCGTGTAAAGCTAAGTTC-3'). The first pair (E1 and E2) specifically detects *Enterococcus faecium* strains, while the second (F1 and F2) is specific for *Enterococcus faecalis*.

Identification of other bacterial species was performed by 16S rRNA PCR sequencing (ABI Prism 3730, Applied Biosystems) using primers plb16 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and mlb16 (5'-GGCTGCTGGCACGTAGTTAG-3') [32]. The resulting sequences with an average size of approximately 550 bp, were used to search sequences deposited in the EMBL database using BLAST algorithm and the identity of the isolates was determined on the basis of the highest scores (>98%).

DNA Extraction from Meconium and Feces

Samples were thawed at room temperature and DNA was extracted from 0.1 g of meconium or feces, previously resuspended in 0.5 mL of extraction buffer (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5% SDS, 25 mM EDTA, 250 mM NaCl, 20 mg/mL lysozyme, 5 µg/mL lysostaphin) and 0.3 mL of 3 M Na acetate. Then, mechanical lysis was performed by three times of bead-beating with 0.1 mm diameter zirconia/silica beads (Sigma) using a FastPrep disruptor (QBioGene, Irvine, CA, USA) at a speed setting of 6.0 m/s for 30 s. The lysate solution was treated with 0.1 mg/mL of proteinase K (Sigma), and incubated for 30 min at 37°C. Following incubation, 0.1 mL of 1.5 M NaCl was added to the lysate and mixed. After incubation for 5 min at room temperature, the mixture was centrifuged at 16,000 ×g to pellet the insoluble cell debris. The supernatant was transferred into a new tube and extracted twice with an equal volume of phenol/chloroform/isoamyl-alcohol (25:24:1) (Sigma). The DNA was precipitated by adding 0.6 volumes of isopropanol (Sigma) and incubating at −20°C for 1 h. The DNA was pelleted, washed with 70% ethanol, allowed to air dry, and finally resuspended in TE buffer. The DNA yield was measured using a NanoDrop® ND-1000 UV spectrophotometer (Nano-Drop Technologies, Wilmington, DE).

PCR Amplification and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE)

DGGE of PCR-amplified 16 s rRNA gene fragments was used to initially compare overall bacterial diversity in meconium and feces (3rd week) from 5 infants. To this purpose, primers U968-GC-f (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGCGGGG GCACGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC-3') and L1401-r (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3') [33,34] were used to amplify the V6 to V8 regions of the 16S rRNA gene. Then, amplicons were separated by DGGE [35] using a DCode System (Bio-Rad Laboratories). The DGGE profiles were digitally normalized by comparison with a standard pattern using InfoQuest FP software (Bio-Rad Laboratories). Cluster analysis of DGGE profiles was

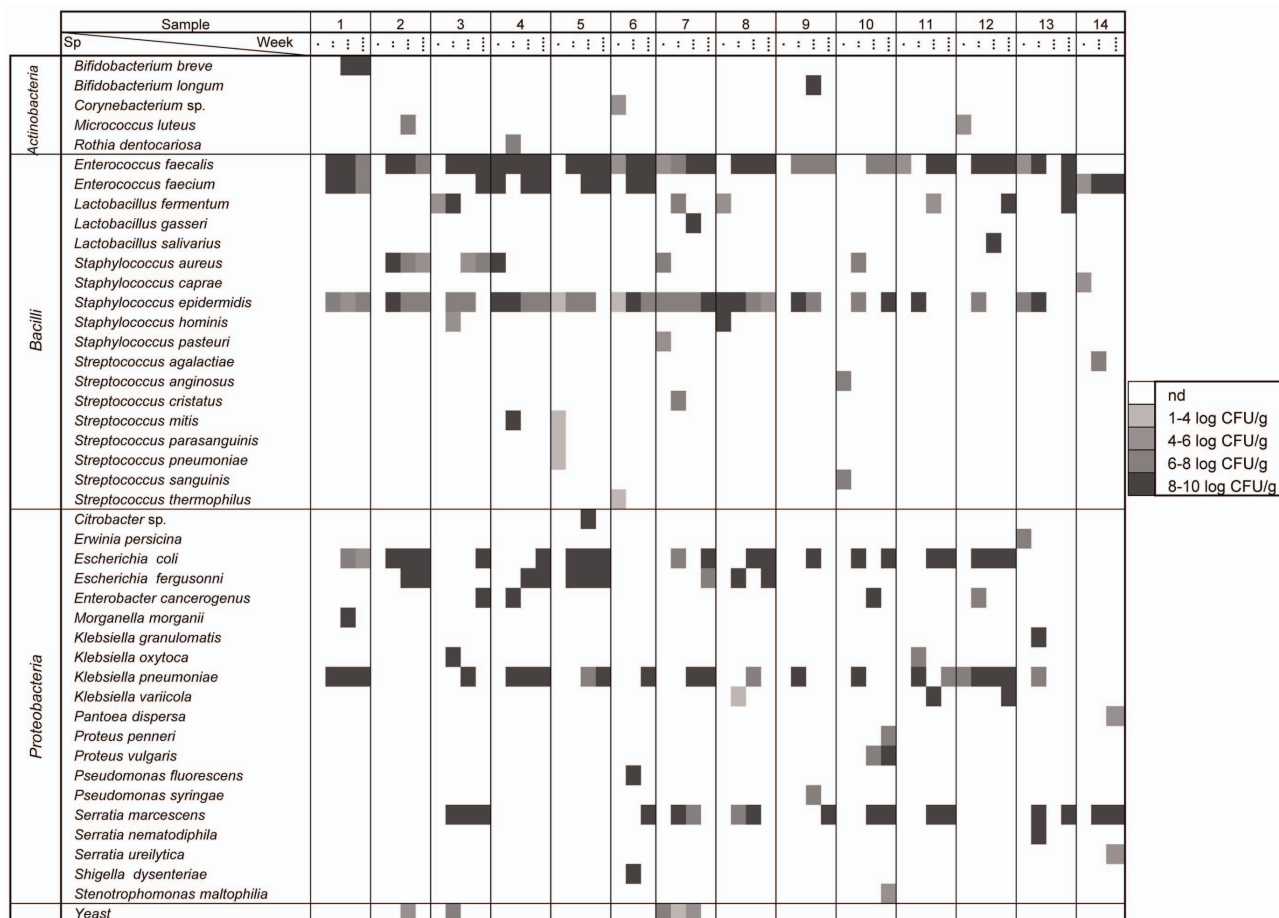


Figure 1. Counts of microbial species isolated and identified by species-specific PCR or 16S rRNA sequencing PCR. Forty-four different species were isolated and identified in some or all the samples analyzed (meconium (·), 1st week (··), 2nd week (···) and 3rd week (····) fecal samples). Concentrations of the identified species are represented in a grey scale from non detected (nd) in white to 8–10 log₁₀ CFU/mL in black. doi:10.1371/journal.pone.0066986.g001

performed using the Neighbor Joining method based on the DICE similarity coefficient.

Human Intestinal Tract Chip (HITChip) Analysis

The HITChip microarray consists of over 4,800 oligonucleotide probes targeting the V1 and V6 hypervariable regions of the 16S rRNA gene from 1,132 phylotypes, spotted in duplo on custom 8×15 K format arrays (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). The array probes were organized based on their 16S rRNA sequences on three levels of phylogeny, as described before [36]. The HITChip signal intensity was analyzed using the following phylogenetic assignment levels: 1) the phylum-level, with the specification of *Firmicutes* down to *Clostridium* clusters and other classes, creating altogether 23 groups; 2) the genus-like level, including 131 groups of sequences with ≥90% sequence identity, and 3) the phylotype (species-like) level with 1,038 distinct phylotypes with ≥98% sequence similarity to cultured species or clones corresponding to uncultured microorganisms. Genus-level taxa with ≥90% sequence identity distributed over multiple genera are termed “*et rel.*”.

All the steps for the HITChip microarray analysis, including PCR amplification of 16S rRNA genes, RNA production and labeling, hybridization and data extraction, were performed basically as described by Rajilic-Stojanovic et al. [34]. Briefly,

full-length 16S rRNA gene was amplified using primers T7prom-Bact-27-for (5'-TGAATTGTAATACGACTCACTA-TAGGGGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and Uni-1492-rev (5'-CGGCTACCTTGTTCAGAC-3'), which ensures the introduction of a T7 promoter sequence at the 5' terminus of the rRNA gene amplicon. Then, the PCR products were purified by using the High Pure PCR Product Purification kit (Roche, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. *In vitro* transcription of the T7 promoter-carrying 16S rRNA genes was performed using the Riboprobe System (Promega, Madison, WI, USA) while amino-allyl-modified nucleotides were coupled with CyDye using the Post-Labeling Reactive Dye (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK).

Data were extracted from the microarray images using the Agilent Feature Extraction software, version 9.1 (<http://www.agilent.com>), subsequently normalized, and further analyzed using a set of R-based scripts (<http://r-project.org>) in combination with a custom-designed relational database that runs under the MySQL database management system (<http://www.mysql.com>; [34]). Hierarchical clustering of probe profiles was carried out using the Pearson distance and Ward's minimum variance method. Normalized hybridization signals for 23 Level 1 groups and 131 Level 2 groups are available in Table S1 and Table S2 respectively.

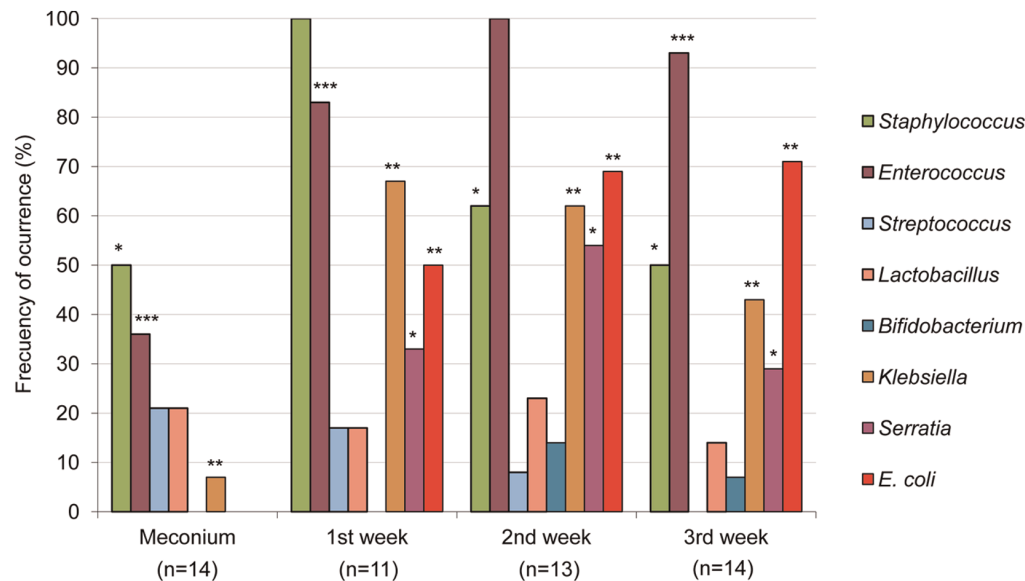


Figure 2. Cultivable bacteria in meconium and fecal samples analyzed in this study. Frequency of occurrence is the percentage of samples in which a particular bacterial genus was detected at each sampling time (meconium, 1st week, 2nd week and 3rd week feces). The total number of weekly samples analyzed is indicated under each sampling time. Results of the Fisher exact probability test (Freeman-Halton extension for a 2×4 contingency table) are shown by asterisks. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0066986.g002

Statistical Analysis

Quantitative data were expressed as the mean and 95% confidence interval (CI) of the mean or, when they were not normally distributed, as the median and interquartile range (IQR). The richness and diversity of the preterm infants' meconium and fecal microbiota were determined by calculating the Shannon-Weaver diversity index, which takes into account the number and evenness of the bacterial species. Fisher's exact test and the

Freeman-Halton extension of the Fisher exact probability test for a 2×3 contingency tables were used to compare proportions. Friedman's non-parametric repeated measures comparisons and paired samples *t*-tests were applied to determine differences between the bacterial counts of each identified microbial group or the hybridization signal intensities of genus-like bacterial groups across time. Principal component analysis (PCA) was applied to the dataset gathering the microbiological profile of all meconium

Table 3. Microbial groups isolated from meconium and feces of preterm neonates in this study.

Microorganism	Meconium (N = 14)			1 st week feces (N = 12)		2 nd week feces (N = 13)		3 rd week feces (N = 14)		P-value**
	n	Mean (95% CI)*		n	Mean (95% CI)	n	Mean (95% CI)	n	Mean (95% CI)	
<i>Staphylococcus</i>	7	6.48 (3.95; 9.01)		12	7.84 (7.38; 8.31)	8	7.05 (6.26; 7.83)	7	7.22 (6.29; 8.15)	0.037
<i>Enterococcus</i>	5	6.15 (3.64; 8.66)		10	8.73 (8.28; 9.18)	13	8.63 (8.13; 9.14)	13	8.26 (7.41; 9.11)	0.003
<i>Streptococcus</i>	3	4.77 (0.07; 9.46)		2	7.86	1	6.40	0		0.236
<i>Lactobacillus</i>	3	5.27 (2.83; 7.70)		2	7.52	4	7.19 (2.48; 11.90)	2	6.23	0.884
<i>Bifidobacterium</i>	0			0		2	9.12	1	9.53	0.145
Other G+	2	5.20		1	7.70	1	7.70	0		0.625
<i>Klebsiella</i>	1	7.27		8	9.18 (8.80; 9.55)	8	8.95 (8.13; 9.78)	6	8.72 (8.11; 9.32)	0.004
<i>Serratia</i>	0			4	8.73 (6.82; 10.64)	7	9.16 (8.80; 9.53)	4	9.22 (7.80; 10.63)	0.009
<i>E. coli</i>	0			6	8.91 (7.89; 9.92)	9	9.05 (8.55; 9.55)	10	8.75 (7.97; 9.53)	0.003
Other G-	1	6.38		1	9.22	5	8.76 (7.33; 10.18)	4	8.40 (5.51; 11.30)	0.118
Yeast	1	6.08		1	7.70	2	5.20	0		0.603

*Mean bacterial counts were expressed as log₁₀ CFU/mL.

**Friedman's tests.

N, total number of samples.

n, number of samples where a specific microbial group was detected.

Other Gram-positive bacteria included the following genera: *Corynebacterium*, *Micrococcus* and *Rothia*.

Other Gram-negative bacteria included the following genera: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Morganella*, *Pantoea*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Shigella* and *Stenotrophomonas*.

doi:10.1371/journal.pone.0066986.t003

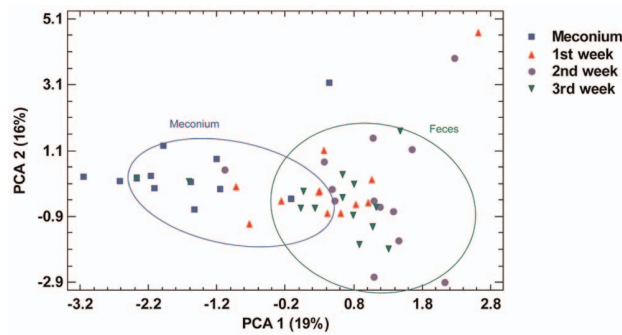


Figure 3. Principal component analysis (PCA) of microbiological profiles of cultivable bacteria. PCA was performed based on the bacterial counts of cultivable bacteria detected at each sampling time: meconium, 1st, 2nd and 3rd week feces. doi:10.1371/journal.pone.0066986.g003

and feces samples obtained after culture methods, to group samples according to their characteristics. Differences were considered significant at $P < 0.05$. Statgraphics Centurion XVI version 16.1.15 (Statpoint Technologies Inc., Virginia, USA) and R 2.13.2 (R project, Statistical Software) software were used to carry out the analyses cited above.

Results

Characteristics of the Infants

The 14 infants enrolled in this study had a mean gestational age of 28 weeks (ranging from 24 to 32 weeks), a mean birth weight of 1,288 g (ranging from 600 to 2,190 g) (Table 1). Half of the infants ($n = 7$) were born by Cesarean section, all of them, except one, received antibacterial prophylaxis at least for the first 3 days of life, and half of them needed mechanical ventilation (Table 2). Infants were fed either with their own mother's breast milk, donor milk and/or preterm formula by nasogastric feeding tube for, at least, 18 days after delivery. The time required for spontaneous delivery of the first meconium oscillated between the first minutes to day 5 after birth. The main characteristics of the infants are presented in Tables 1 and 2.

Culture Analysis of the Meconium and Fecal Samples

A total of 14 meconium and 39 fecal samples were collected weekly during the first three weeks of life; on average, 3.8 samples per infant were analyzed (Table 1). Globally, inoculation of suitable dilutions of all the samples led to bacterial growth on the culture media tested, with the exception of three meconium samples (infants 1, 2, and 9) (Figure 1).

Identification of the isolates obtained from the different growth media revealed that the most abundant genera in all the tested samples were *Staphylococcus* and *Enterococcus*, which were detected in 77% and 64% of the samples, respectively. However, the distribution of these two genera throughout the sampling times was different (Figure 2). Staphylococci predominated in meconium and 1st week's fecal samples, being present in 50% and 100% of the samples, respectively, with *S. epidermidis* and *S. aureus* as the most abundant species. Other staphylococcal species, such as *Staphylococcus caprae*, *S. hominis* and *Staphylococcus pasteurii*, were occasionally isolated from meconium or 1st week's fecal samples (Figure 1). In contrast, *Enterococcus* was the predominant bacterial genus in the 2nd and 3rd week's fecal samples (100% and 93%, respectively) (Figure 2). *E. faecalis* and *E. faecium* could be isolated from 13 and 7 fecal samples, respectively (Figure 1).

Interestingly, Streptococcus species, such as *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus thermophilus*, were mainly isolated from meconium samples (Figure 1). The presence of lactobacilli and bifidobacteria was scarce among the isolates obtained on MRScys agar plates. *Lactobacillus fermentum* was isolated from 6 samples while *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus salivarius*, *Bifidobacterium breve* and *Bifidobacterium longum* could only be isolated from the feces of one infant each (Figure 1). In contrast to streptococci, Gram-negative bacteria, such as *E. coli*, *Escherichia fergusonii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*, were isolated exclusively from 1st, 2nd and/or 3rd week's fecal samples (Figure 1).

Occasionally, other Gram-positive (belonging to the genera *Corynebacterium*, *Micrococcus* and *Rothia*), and Gram-negative bacteria (belonging to the genera *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Morganella*, *Pantoea*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Shigella* and *Stenotrophomonas*), as well as some yeasts, were also isolated from the meconium and fecal samples analyzed in this study (Table 3, Figure 1).

Potential associations between demographic and clinical parameters and isolation of the different genera during at least

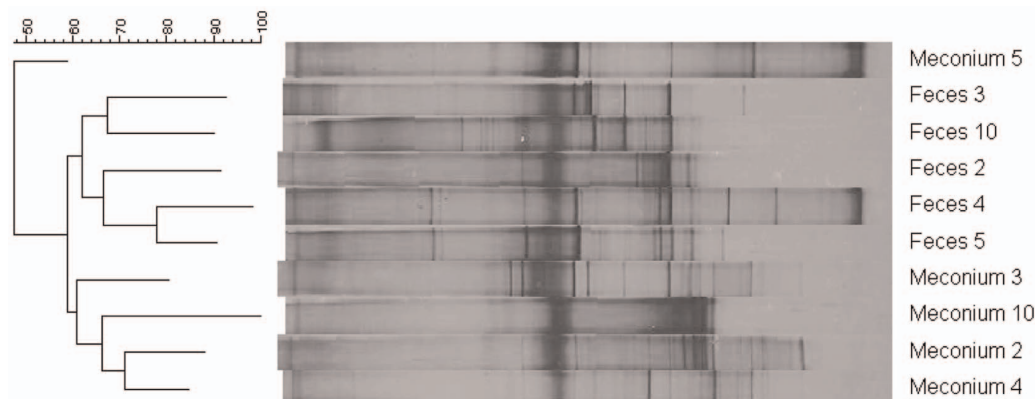


Figure 4. Cluster analysis of DGGE profiles. The analysis was performed using the Neighbor Joining method based on the Dice similarity coefficient in meconium and 3rd week feces from infants 2, 3, 4, 5, and 10. doi:10.1371/journal.pone.0066986.g004

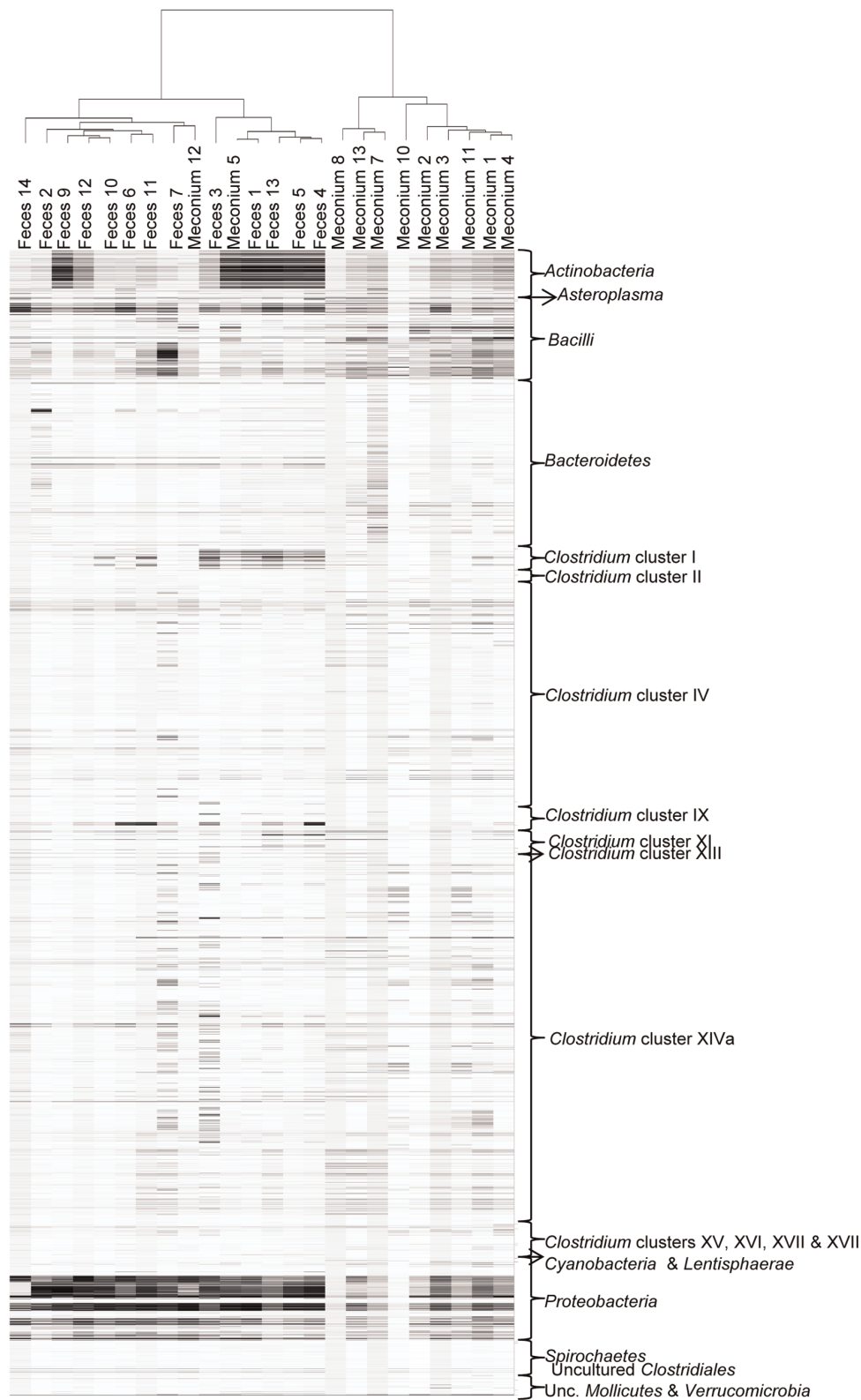


Figure 5. Phylogenetic fingerprints of the meconium and 3rd week fecal microbiota of 14 preterm infants. The highest phylogenetic level of specificity of probes is described on the right side of the figure. Darkness of the spot corresponds to the bacterial abundance in the sample. Pearson correlation and Ward's clustering method were used.
doi:10.1371/journal.pone.0066986.g005

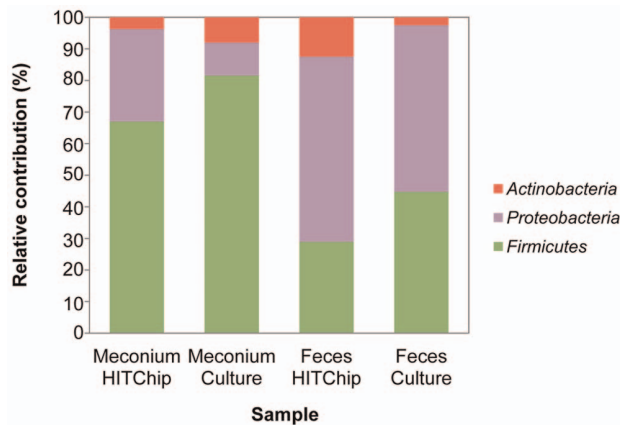


Figure 6. Phyla in the microbiota of meconium and feces analyzed by HITChip and culture-based techniques. The relative contribution of the phyla to the microbiota of meconium and 3rd week fecal samples of fourteen infants detected by culture techniques is shown. In the figure, data for these phyla obtained by HITChip is compared.

doi:10.1371/journal.pone.0066986.g006

two weeks in fecal samples were assessed using Fisher's tests. The isolation of the genera *Serratia* seemed to be strongly influenced by demographic or clinical variables related to prematurity. In fact, the presence of *Serratia* was significantly more frequent when the gestational age was <30 weeks ($P = 0.020$), in longer hospital stay (>35 days; $P = 0.027$) and in prolonged antibiotherapy treatment (>3 days; $P = 0.002$). Similarly, samples from infants that required mechanical ventilation showed a higher frequency of *Serratia*

($P = 0.050$). The isolation of other genera or bacterial groups was not affected by any qualitative variable (Table S3).

Total bacterial counts found when meconium samples were cultured in general media, such as BHI and WC, ranged from 3.65 to 9.85 \log_{10} CFU/g whereas in feces samples oscillated between 6.70 and 10.09 \log_{10} CFU/g. Mean *Staphylococcus* counts in fecal samples were approximately 1 \log_{10} CFU/g higher than in the meconium ones while bacterial counts of other genera, such as *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* or *Klebsiella*, were at least 2 log CFU/g higher in feces than in meconium; however, the differences were statistically-significant only for the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Serratia* and *E. coli* (Table 3).

To visualize if differences in microbiological profiles of meconium and fecal samples analyzed in this study existed, principal component analysis (PCA) was applied to the whole dataset of bacterial counts. In the score plot containing the first and second PCs, which account for 36% of total variance, it was observed that meconium samples clustered apart from fecal samples, particularly along the PC1 dimension (Figure 3).

PCR-DGGE Analysis

Meconium and 3rd week's fecal samples from 5 infants were submitted to PCR-DGGE profiling. The number of major bands in individual infants ranged from 3 to 8 dominant bands. Visual comparison between the DGGE patterns revealed distinctive differences between meconium and fecal samples, being the diversity higher among the fecal ones. DGGE profiles were analyzed by the Neighbor Joining method based on the Dice similarity coefficient. Globally, the profiles clustered in two groups, one including those corresponding to the meconium samples while the second comprised those obtained from 3rd week's feces. The only exception was the meconium sample collected from infant 5 which clustered with fecal samples. DGGE analyses also revealed a

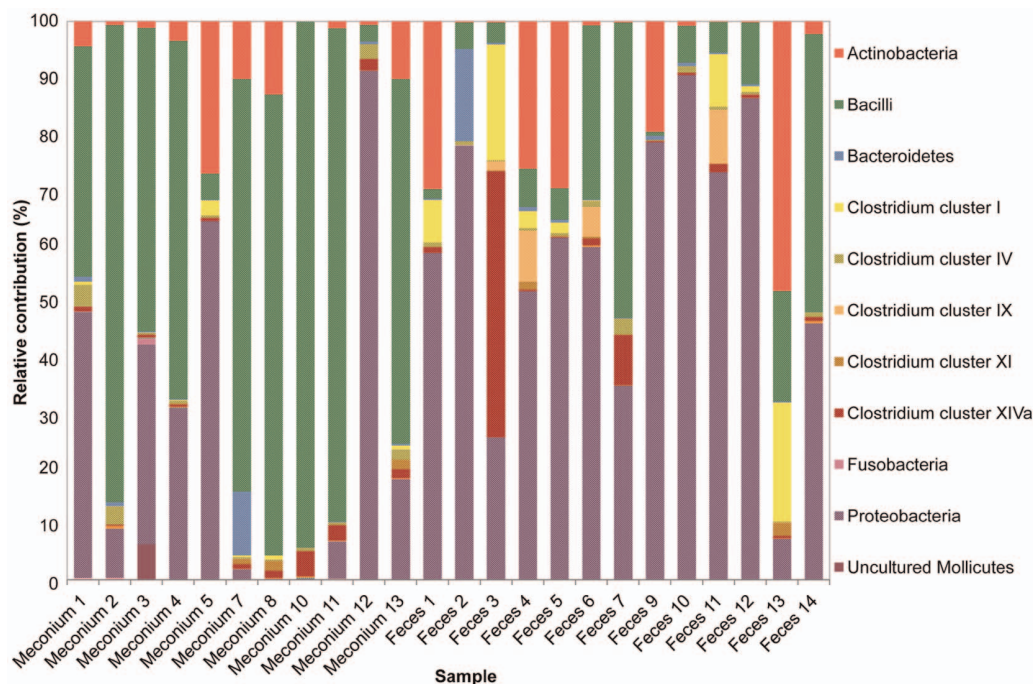


Figure 7. Relative contribution of the phylum/order-like phylogroups to the microbiota of studied infants assessed by HITChip. Phylum/order-like phylogroups detected in meconium and 3rd week fecal samples by HITChip are presented. Only phylum/order-like phylogroups that contributed for at least 0.5% to a given profile are shown.

doi:10.1371/journal.pone.0066986.g007

Table 4. Abundance of genus-like bacterial groups detected in meconium and 3rd week feces using the HITChip microarray.

Phylum/order	Genus-like phylogenetic group [*]	Meconium samples Mean (95% CI) [†]	3 rd week fecal samples Mean (95% CI)	P-value [*]
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium</i>	3.28 (2.55; 4.01)	4.07 (3.21; 4.93)	0.140
	<i>Micrococcaceae</i>	3.06 (2.21; 3.92)	2.97 (2.59; 3.35)	0.957
	<i>Propionibacterium</i>	3.63 (3.16; 4.11)	2.27 (1.97–2.77)**	<u>0.004</u>
Bacteroidetes	<i>Bacteroides splachnicus et rel.</i>	2.38 (1.83; 2.92)	3.48 (3.15; 3.82)	<u>0.005</u>
	<i>Prevotella tannerae et rel.</i>	2.06 (1.09; 3.04)	1.22 (0.64; 1.81)	<u>0.040</u>
Bacilli	<i>Aerococcus</i>	2.87 (2.06; 3.69)	3.36 (3.01; 3.72)	0.165
	<i>Bacillus</i>	3.53 (2.94; 4.11)	3.22 (2.87; 3.57)	0.270
	<i>Enterococcus</i>	3.98 (3.23; 4.72)	4.90 (4.62; 5.18)	<u>0.025</u>
	<i>Granulicatella</i>	2.76 (2.14; 3.38)	3.83 (3.50; 4.16)	<u>0.029</u>
	<i>Lactobacillus gasseri et rel.</i>	3.03 (2.54; 3.51)	3.43 (3.01; 3.85)	0.449
	<i>Lactobacillus plantarum et rel.</i>	4.43 (3.71; 5.15)	2.38 (2.05; 2.71)	<u>0.000</u>
	<i>Lactobacillus salivarius et rel.</i>	3.18 (2.46; 3.91)	3.56 (3.26; 3.86)	0.468
	<i>Lactococcus</i>	3.23 (2.44; 4.02)	1.63 (0.54; 2.71)	0.065
	<i>Staphylococcus</i>	3.79 (2.97; 4.61)	3.08 (2.60; 3.56)	0.182
	<i>Streptococcus bovis et rel.</i>	3.26 (2.90; 3.63)	2.76 (2.39–3.09)**	0.361
	<i>Streptococcus intermedius et rel.</i>	3.72 (3.12; 4.32)	2.60 (1.91; 3.28)	<u>0.018</u>
	<i>Streptococcus mitis et rel.</i>	4.25 (3.71; 4.79)	2.95 (2.33; 3.58)	<u>0.006</u>
	<i>Weissella et rel.</i>	2.40 (1.54; 3.25)	2.83 (2.20; 3.47)	0.263
Clostridium cluster I	<i>Clostridia</i>	2.88 (2.18; 3.57)	3.80 (2.93; 4.67)	<u>0.013</u>
Clostridium cluster IV	<i>Clostridium leptum et rel.</i>	2.86 (2.36; 3.35)	2.99 (2.52; 3.46)	0.717
	<i>Clostridium orbiscindens et rel.</i>	2.91 (2.36; 3.45)	1.45 (1.09–1.72)	0.089
	<i>Sporobacter termitidis et rel.</i>	3.03 (2.35; 3.71)	3.39 (2.97; 3.82)	0.203
Clostridium cluster IX	<i>Veillonella</i>	1.08 (–0.01; 2.17)	2.90 (1.95; 3.85)	<u>0.034</u>
Clostridium cluster XI	<i>Clostridium difficile et rel.</i>	2.79 (2.21; 3.36)	3.06 (2.57; 3.54)	<u>0.013</u>
Clostridium cluster XIVa	<i>Anaerostipes caccae et rel.</i>	2.45 (1.93; 2.96)	2.43 (2.12; 2.73)	0.961
	<i>Bryantella formatexigens et rel.</i>	2.29 (1.80; 2.80)	2.16 (1.42; 2.89)	0.985
	<i>Butyrivibrio crossotus et rel.</i>	2.39 (1.85; 2.94)	1.55 (1.34–1.68)**	0.111
	<i>Ruminococcus obeum et rel.</i>	2.47 (1.94; 3.00)	1.92 (1.49; 2.34)	0.114
	<i>Anaerobiospirillum</i>	2.13 (1.66; 2.61)	3.93 (3.47; 4.40)	<u>0.001</u>
Proteobacteria	<i>Aquabacterium</i>	2.86 (2.15; 3.58)	0.28 (–0.86; 1.42)	<u>0.001</u>
	<i>Burkholderia</i>	3.14 (2.27; 4.00)	1.69 (1.15; 2.23)	0.074
	<i>Enterobacter aerogenes et rel.</i>	3.69 (2.79; 4.59)	4.78 (4.46; 5.10)	0.096
	<i>Escherichia coli et rel.</i>	3.63 (2.54; 4.72)	5.47 (5.18; 5.75)	<u>0.043</u>
	<i>Haemophilus</i>	3.31 (2.49; 4.12)	4.25 (4.05; 4.46)	<u>0.026</u>
	<i>Klebsiella pneumoniae et rel.</i>	3.90 (2.88; 4.93)	5.33 (5.06–5.38)**	<u>0.034</u>
	<i>Leminorella</i>	2.66 (2.04; 3.29)	3.08 (2.56; 3.60)	0.822
	<i>Proteus et rel.</i>	3.05 (2.23; 3.87)	3.89 (3.61–4.33)**	0.259
	<i>Pseudomonas</i>	3.31 (2.49; 4.12)	4.19 (3.98; 4.41)	<u>0.038</u>
	<i>Serratia</i>	3.01 (2.18; 3.83)	3.95 (3.74; 4.16)	<u>0.031</u>
	<i>Sutterella wadsworthia et rel.</i>	3.57 (2.99; 4.13)	3.38 (3.22–3.45)**	0.864
	<i>Vibrio</i>	3.45 (2.55; 4.34)	4.50 (4.37–4.52)**	0.303
	<i>Xanthomonadaceae</i>	2.81 (1.93; 3.69)	2.50 (2.04; 2.96)	<u>0.001</u>
	<i>Yersinia et rel.</i>	3.51 (2.51; 4.50)	4.91 (4.65; 5.18)	<u>0.042</u>

^{*}The genus-like phylogenetic groups shown contributed, at least, 0.5% to the microbial profile of a given sample.

[†]Kruskal-Wallis tests.

[†]Mean (95% CI) of the log-transformed signal intensities.

^{**}Median (IQR) of the log-transformed signal intensities.

Significant changes in abundance of genus-like bacterial groups underlined (*P* values <0.05).

doi:10.1371/journal.pone.0066986.t004

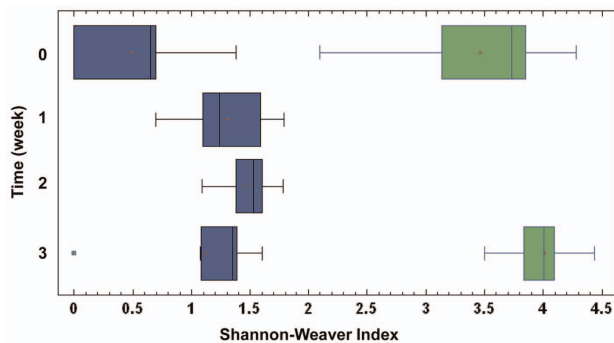


Figure 8. Shannon-Weaver diversity indices from culture and HITChip results. Boxes in blue represent Shannon-Weaver diversity index obtained with culture techniques in meconium (0 week), 1st, 2nd and 3rd week feces. Boxes in green represent Shannon-Weaver diversity index obtained with HITChip in meconium (0 week) and 3rd week feces. doi:10.1371/journal.pone.0066986.g008

high degree of inter-individual variability among the samples; in fact, similarity values were low, ranging from 50% to 75% (Figure 4).

HITChip Analysis

The microarray datasets of 11 meconium and 13 fecal samples collected in the 3rd week were acquired and hierarchically clustered in a heat map based on the signal intensity of the 3,699 distinct HITChip oligonucleotide probes (Figure 5). Meconium samples (with the exception of those corresponding to infants 5 and 12) and 3rd week's fecal samples clustered significantly according to the type of sample (meconium *versus* feces).

The relative contributions of the major phyla were assessed by calculating the percentages of the phylum/order taxa in the meconium and 3rd week fecal microbiota. Globally, *Firmicutes* was the most abundant phylum in meconium samples, accounting for approximately 63.4% (95% CI: 42.2%–84.6%) of the signals, followed by *Proteobacteria* (27.7%; 95% CI: 7.61%–47.7%) and *Actinobacteria* (3.5%; IQR: 0.63–10.3) (Figure 6). In contrast, *Proteobacteria* was the dominant phylum in the 3rd week's fecal samples (57.6%; 95% CI: 42.8–72.5), followed by *Firmicutes* (28.4%; CI 95%: 13.8–43.0%) and *Actinobacteria* (12.2%; 95% CI: 2.2%–22.2%). The relative frequency of the three cited phyla differed significantly between the meconium and the fecal samples (Chi-square test; $P = 0.021$, $P = 0.052$, and $P \leq 0.001$ for *Firmicutes*, *Proteobacteria*, and *Actinobacteria*, respectively). *Bacteroidetes* represented approximately 1% (IQR: 0.1%–0.68%) of the signals in both types of samples (Figure 5 and 7).

Among *Firmicutes*, those belonging to the class *Bacilli* were the most abundant both in meconium (59.8%; 95% CI: 38.4%–81.1%) and 3rd week feces (15.4%; 95% CI: 4.5%–26.3%) samples. However, *Firmicutes* diversity was larger in the fecal samples since other groups were also detected at a relatively high percentage, including *Clostridium* cluster I (5.0%; 95% CI: 0.3%–9.7%), *Clostridium* cluster XIVa (4.9%; IQR: 0.3%–1.3%), and *Clostridium* cluster IX (2.0%; IQR: 0.0%–1.6%) (Figure 7). Fecal samples from infants 3 and 13 showed a different microbial profile with a higher abundance of *Clostridium* clusters and *Actinobacteria*, respectively (Figure 7).

On a lower taxonomic level, the comparison of the 131 hybridization signals, corresponding to the genus-like bacterial groups (level 2), obtained from meconium and fecal samples showed that 38 phylogenetic groups differed significantly between both types of samples. Among them 20 phylogenetic groups

contributed for at least more than 0.5% to the microbial profile of each sample (Table 4). The presence of genus-like groups such as *Propionibacterium*, *Lactobacillus plantarum* *et rel.*, *Streptococcus intermedius* *et rel.* and *Str. mitis* *et rel.* decreased significantly from meconium to fecal samples. On the other hand, there was a significant increase in the abundance of groups such as *Bacteroides splachnicus* *et rel.*, *Enterococcus*, *Clostridia*, *Veillonella*, *Clostridium difficile* *et rel.*, *E. coli* *et rel.*, *K. pneumoniae* *et rel.*, *Pseudomonas*, *Serratia* and *Yersinia* *et rel.* groups from meconium to the fecal samples (Table 4). Among the phylogenetic groups contributing $\geq 0.1\%$ to the fecal profiles, *Enterobacter aerogenes* *et rel.*, *Enterococcus*, *E. coli* *et rel.*, *Haemophilus*, *K. pneumoniae* *et rel.*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Vibrio* and *Yersinia* *et rel.* were detected in all the fecal samples, adding up to approximately 55% of the total hybridization signals in ten of them. In contrast, only two phylotype groups, *L. plantarum* *et rel.* and *Str. mitis* *et rel.*, formed a core microbiome in meconium samples, while there was a great inter-individual variability for the rest of phylotypes (data not shown).

The detailed analysis of signal intensities of species-like taxa (level 3) showed an average of 441 phylotype-like taxa in the meconium samples and 406 of these in the fecal samples, representing 42% and 39% of the total number of the phylotype-like taxa that were above the signal threshold, respectively. The intensity of the hybridization signals obtained with the oligonucleotide probes corresponding to *L. fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *S. epidermidis*, *Streptococcus viridans* and uncultured *Streptococcus* sp. NB4D2 was particularly strong among the meconium samples, while phylotype probes corresponding to *Enterobacter cloacae*, *E. faecalis*, *E. coli*, *Haefia alvei*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *Serratia liquefaciens* and *Shigella dysenteriae* led to more intense hybridization intensities among the fecal ones (Table S4). Proteobacterial phylotype-like taxa were mainly detected in fecal samples and, also, in the meconium samples obtained from infants 5 and 12 (Table S5). With respect to the *Lactobacillus* and *Lactococcus* phylotype-like taxa, a total of 15 different phylotypes were detected, being the meconium obtained from of infants 1, 2, 4 and 11 the ones that showed the highest diversity (Table S6). In meconium from infant 2, *Lactobacillus* phylotype-like taxa represented 82% of the total hybridization signals while those of *L. reuteri* and *Lactobacillus vaginalis* contributed with 45% and 27% to the total hybridization signals, respectively (Table S6). Bifidobacterial phylotype-like taxa were mainly detected in one meconium (infant 5) and five fecal samples (infants 1, 4, 5, 9 and 13) (Table S7). Among the 12 bifidobacteria phylotype-like taxa detected in this study, those of *B. breve*, *Bifidobacterium catenulatum* and *Bifidobacterium infantis* were the most abundant. In the fecal sample of infant 13, 44% of the hybridization signals corresponded to bifidobacterial species while, in the rest of fecal samples where they were present, they represented between 19 and 27% of the signal intensities (Table S7). Phylotype-like taxa belonging to the *Clostridium* spp. were infrequent either in meconium or fecal samples, except in the fecal sample of infant 13 where they represented 17% of the total hybridization signal (data not shown).

Comparison between the Results Obtained by Cultures and HITChip

Globally, there was a good correlation between the principal phylum/orders detected in the samples by the culturing and molecular approach (Figure 6). In general, the class of the *Bacilli* was the predominant bacterial group among meconium samples whereas *Proteobacteria* was the main phylum observed among the fecal ones.

Considering the genus-like taxonomy level, both culture and HITChip techniques showed that *Enterococcus* was a relevant group

in the meconium and/or feces of the preterm infants. Other genera, such as *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* or *Streptococcus*, could be detected by both techniques but the detection frequency was lower using the culture-based approach (Tables 3 and 4). In addition, the HITChip technique allowed the detection of other bacterial genera, such as *Lactococcus* or *Clostridium* that could not be isolated in the cultures of the respective samples.

Finally, the diversity of the microbial communities obtained by culturing or using the HITChip was also evaluated. The Shannon-Weaver indices obtained with culture techniques were lower than those obtained with the microarray, which indicated a superior sensitivity of the molecular technique (Figure 8). Anyway, both methods revealed higher bacterial diversity in fecal than in meconium samples (Paired t-test; $P=0.016$ and $P=0.011$, for HITChip and culture techniques, respectively). The Shannon diversity index showed a greater variability among the meconium samples (ranging from 0.00 to 1.38 with culture techniques, and from 2.09 to 4.28 with microarrays) than among the fecal ones (ranging from 1.07 to 1.60 with culture techniques, and from 3.50 to 4.43 with microarrays).

Discussion

In the present study, the succession of the bacterial species in meconium and feces of preterm infants in their first 3 weeks of life was assessed by culture-based methods, PCR-DGGE and the HITChip microarray. The combination of culture analysis and culture-independent techniques provided highly complementary views of the microbiota present in the analyzed samples. The results obtained by both approaches showed a good correlation although the HITChip method was most sensitive and led to the detection of higher bacterial diversity, probably due to the different recovery/survival after sample thawing and complex nutritional requirements of some species when using culture methods. Other differences between culture- and molecular-based methods could be related to PCR bias, cross hybridization and difficulty of detection if species are present in low levels, in agreement with previous studies [18]. In general, analysis of meconium and feces of preterm infants revealed low species diversity and high inter-individual variability, as previously described [13,14,37,38]. Bacterial diversity in meconium samples was lower than in feces although the diversity indices obtained in both types of samples upon HITChip analysis were higher than those reported in previous studies [13,14,16]. *Bacilli* and other *Firmicutes* dominated in the meconium and *Proteobacteria* did in the fecal samples. At the genus level, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* and *Lactobacillus* predominated in meconium samples while members of the family Enterobacteriaceae, such as *Escherichia*, *Klebsiella* or *Serratia*, rapidly became dominant in feces, a fact that has been repeatedly reported [11,12,13,14,15,16,38,39]. In a previous work [27] where meconium samples from term healthy babies born at the same hospital were analyzed, *E. coli* and *Leuconostoc* sp. were detected by culture methods, as it has been described recently by Gosalbes et al [7] with molecular techniques. In contrast, in this work these species had not been isolated by culture methods although a low signal intensity of *E. coli* was detected by HITChip in meconium samples of preterm infants. It should be taken into account that freezing can introduce microbiological biases in culture methods as indicated before.

Premature birth usually results in a delayed and abnormal qualitative pattern of gut colonization, which is often described as aberrant in comparison to that of healthy term ones [5,6]. This fact seems to affect infant's health and constitutes a risk factor for

the development of gastrointestinal infections, such as necrotizing enterocolitis [21,40]. In a recent study, where meconium and fecal samples from 6 preterm infants were analyzed by 16S rRNA high throughput pyrosequencing, it was found that gut colonization seemed to follow specific patterns [23]. Subjects who develop sepsis showed a *Proteobacteria* and *Firmicutes* (*Staphylococcus*) predominance. Notably, healthy subjects, who received limited antibiotics (<3 days total) and did not develop sepsis ultimately, exhibited an increase in relative abundance of anaerobes, similarly to more 'mature' microbial communities, including *Clostridium*, *Klebsiella* and *Veillonella* [23]. The fecal microbiota of preterm infants is usually dominated by cultivable bacteria that are prevalent in antibiotic-rich hospital environments, such as NICUs. In this study, presence of *Serratia* was strongly associated with several hospital-related parameters, including antibiotherapy and mechanical ventilation. Fear of infections often leads to an early and widespread use of broad-spectrum antibiotics at the NICUs, a strategy that increases the risk of colonization with resistant bacterial strains [41]. The high influence of the environment is in accordance with previous studies that reported a tendency to uniformity in the bacterial communities of preterm infants during their stay at the NICU [16]. Likewise, it has been recently shown that the NICU was a major determinant influencing clostridia colonization of preterm infants and that antibiotic course influenced the levels of colonization [42]. A recent in depth pyrosequencing study examined the gut-associated microbiome of 11 extremely low birth weight infants in the first postnatal month. This study confirmed that Enterobacteriales, *Staphylococcus*, and *Enterococcus* were among the most abundant bacterial taxa in a low-diversity bacterial community that was dominated by types of bacteria known to cause invasive disease in these infants [12].

In preterm neonates, colonization by strict anaerobes seems particularly delayed [13]. Clostridia colonization varies greatly from baby to baby in the timing of their first appearance while *Bacteroides* and bifidobacteria have been seldom isolated from feces of these infants [38,43,44]. In this study, bifidobacteria and bifidobacterial DNA could be isolated and detected, albeit at a low frequency. A previous study showed that the birth gestational age had a significant impact on infant colonization by bifidobacteria, which always occurred in children born at a birth gestational age greater than 33 weeks [10]. In fact, some studies have evidenced the relatively low frequency and abundance of bifidobacteria in the fecal microbiota at any age from birth to adulthood [6]. These authors suggested that the emphasis on bifidobacteria in studies and reviews of the infant gastrointestinal microbiota may be out of proportion to its prevalence, abundance, and relevance to health. This aspect should be addressed in future work.

Globally, our results indicate that spontaneously-released meconium of preterm neonates harbors a specific microbiota, different to that of feces obtained after the first week of life. Previous studies have shown the presence of a similar cultivable microbiota in umbilical chord's blood and hygienically-collected meconium of term and preterm infants, suggesting that fetal gut may not be sterile before delivery and that, therefore, at least a part of the bacteria found in meconium has not a postnatal origin [14,26,27].

Probably, such bacteria could reach the fetal gut through *in utero* swallowing of amniotic fluid. Culture-dependent and -independent studies have revealed that there are bacteria in human amniotic fluid without rupture of membranes [24]. Previously, we showed that oral administration of an enterococcal strain to pregnant mice led to their presence in amniotic fluid and meconium obtained by Cesarean section [26]; this fact is not surprising since it has been reported that bacteria of the digestive tract can reach amniotic

fluid through the blood stream [45]. Another study carried out in pregnant women focused on the influence of the composition of their oral microbiota in the pregnancy outcome and showed that some bacteria, such as *Actinomyces naseundii*, were associated to lower birth weight and earlier delivery, while others, such as lactobacilli, were linked with a higher birth weight and later delivery date. The results of such study suggested that oral bacteria can enter the uterine environment through the bloodstream and may influence the delivery process [46]. Streptococci and staphylococci seemed to be among the dominant bacteria in the meconium samples and, interestingly, their presence in chorioamnion samples of healthy mothers submitted to caesarean section has been described previously [47]. The potential existence of initial gut colonization during the fetal stage deserves future research since it could have important health implications; as an example, its modulation during pregnancy could help to avoid premature deliveries.

Supporting Information

Table S1 Normalized hybridization signal for all 23 Level 1 (phylum-like) phylogenetic groups targeted by the HITChip. (XLSX)

Table S2 Normalized hybridization signal intensity for all 131 Level 2 (genus-like) phylogenetic groups targeted by the HITChip. (XLSX)

References

- Blaut M, Clavel T (2007) Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *J Nutr* 137 (3 Suppl 2): 751S–755S.
- Dethlefsen L, Eckburg PB, Bik EM, Relman DA (2006) Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol Evol* 21: 517–523.
- Favier CF, de Vos WM, Akkermans AD (2003) Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies. *Anaerobe* 9: 219–229.
- Hong PY, Lee BW, Aw M, Shek LP, Yap GC, et al. (2010) Comparative analysis of fecal microbiota in infants with and without eczema. *PLoS ONE* 5: e9964.
- Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, et al. (2011) Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA* 108 Suppl 1: 4578–4585.
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO (2007) Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 5: e177.
- Gosalbes MJ, Llop S, Vallès Y, Moya A, Ballester F, et al. (2013) Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clin Exp Allergy* 43(2): 198–211.
- Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V (2003) Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl* 91: 48–55.
- Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, et al. (2006) Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118: 511–521.
- Butel MJ, Suau A, Campeotto F, Magne F, Aires J, et al. (2007) Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: a prospective analysis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 44: 577–582.
- Gewolb IH, Schwalbe RS, Taciak VL, Harrison TS, Panigrahi P (1999) Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* Ed 80: F167–173.
- LaTuga MS, Ellis JC, Cotton CM, Goldberg RN, Wynn JL, et al. (2011) Beyond bacteria: a study of the enteric microbial consortium in extremely low birth weight infants. *PLoS One* 6: e27858.
- Magne F, Abély M, Boyer F, Morville P, Pochart P, et al. (2006) Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by sequences of 16S rRNA genes and PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles. *FEMS Microbiol Ecol* 57: 128–38.
- Mshvildadze M, Neu J, Shuster J, Theriaque D, Li N, et al. (2010) Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques. *J Pediatr* 156: 20–25.
- Sakata H, Yoshioka H, Fujita K (1985) Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *Eur J Pediatr* 144: 186–190.
- Schwartz A, Gruhl B, Löbnitz M, Michel P, Radke M, et al. (2003) Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr Res* 54: 393–399.
- Wang Y, Hoenig JD, Malin KJ, Qamar S, Petrof EO, et al. (2009) 16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *ISME J* 3: 944–954.
- Rougé C, Goldenberg O, Ferraris L, Berger B, Rochat F, et al. (2010) Investigation of the intestinal microbiota in preterm infants using different methods. *Anaerobe* 16: 362–370.
- Hooper LV, Gordon JI (2001) Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292: 1115–1118.
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI (2006) Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444: 1022–1023.
- Claud EC, Walker WA (2001) Hypothesis: inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis. *FASEB J* 15: 1398–1403.
- de la Cochetiere MF, Piloquet H, des Robert C, Darmaun D, Galmiche J, et al. (2004) Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis in premature infants: The putative role of *Clostridium*. *Pediatr Res* 56: 366–370.
- Madan JC, Salari RC, Saxena D, Davidson L, O'Toole GA, et al. (2012) Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* Ed 97(6): F456–462.
- DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, et al. (2008) Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS ONE* 3: e3056.
- Hufnagel M, Liese C, Loescher C, Kunze M, Proempeler H, et al. (2007) Enterococcal colonization of infants in a neonatal intensive care unit: associated predictors, risk factors and seasonal patterns. *BMC Infect Dis* 7: 107.
- Jiménez E, Fernández L, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, et al. (2005) Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol* 51: 270–274.
- Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, et al. (2008) Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol* 159: 187–193.
- Satokari R, Gronroos T, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E (2009) *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* DNA in the human placenta. *Lett Appl Microbiol* 48: 8–12.
- Ruiz-Barba JL, Maldonado A, Jiménez-Díaz R (2005) Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Anal Biochem* 347: 333–335.
- Jiménez E, Delgado S, Maldonado A, Arroyo R, Albújar M, et al. (2008) *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC Microbiol* 8: 143.

Table S3 Associations between demographic and clinical data and the presence of the isolated genera or microbial group during at least two weeks in the analyzed assessed using Fisher's tests. (DOCX)

Table S4 Dominant phylotypes in meconium and 3rd week fecal samples detected by HITChip. (DOCX)

Table S5 Proteobacterial phylotypes detected in meconium and 3rd week fecal samples using HITChip technique. (DOCX)

Table S6 Lactobacilli and lactococci phylotypes detected in meconium and 3rd week fecal samples using HITChip technique. (DOCX)

Table S7 Bifidobacterial phylotypes detected in meconium and 3rd week fecal samples using HITChip technique. (DOCX)

Acknowledgments

We would like to thank all the families that participated in this study.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LM MG GB JMR EJ. Performed the experiments: LM MG HH EJ. Analyzed the data: LM MG SF LF EJ. Contributed reagents/materials/analysis tools: WdV JMR. Wrote the paper: LM MG HH GB SF WdV LF JMR EJ. Recruitment of the volunteers and samples collection: GB.

31. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P (1995) Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 33: 24–27.
32. Kullen MJ, Sanozky-Dawes RB, Crowell DC, Klaenhammer TR (2000) Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *J Appl Microbiol* 89: 511–516.
33. Felske A, Akkermans ADL, de Vos WM (1998) Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 64: 4581e–4587e.
34. Nubel U, García-Pichel F, Muyzer G (1997) PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* 63: 3327–3332.
35. Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden GA (1993) Profiling of complex populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695–700.
36. Rajilić-Stojanović M, Heilig HG, Molenaar D, Kajander K, Surakka A, et al. (2009) Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environ Microbiol* 11: 1736–1751.
37. Favier CF, Vaughan EE, de Vos WM, Akkermans ADL (2002) Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol* 68: 219–226.
38. Jacquot A, Neveu D, Aujoulat F, Mercier G, Marchandin H, et al. (2011) Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *J Pediatr* 158: 390–396.
39. Blakey JL, Lubitz L, Barnes GL, Bishop RF, Campbell NT, et al. (1982) Development of gut colonisation in pre-term neonates. *J Med Microbiol* 15: 519–529.
40. Siggers RH, Siggers J, Thymann T, Boye M, Sangild PT (2011) Nutritional modulation of the gut microbiota and immune system in preterm neonates. *J Nutr Biochem* 22: 511–521.
41. de Man P, Verhoeven BA, Verbrugh HA, Vos MC, van den Anker JN (2000) An antibiotic policy to prevent emergence of resistant bacilli. *Lancet* 355: 973–978.
42. Ferraris L, Butel MJ, Campeotto F, Vodovar M, Rozé JC, et al. (2012) Clostridia in premature neonates' gut: incidence, antibiotic susceptibility, and perinatal determinants influencing colonization. *PLoS One* 7: e30594.
43. Rougé C, Piloquet H, Butel MJ, Berger B, Rochat F, et al. (2009) Oral supplementation with probiotics in very-low-birth-weight preterm infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* 89: 1828–1835.
44. Campeotto F, Suau A, Kapel N, Magne F, Viallon V, et al. (2011) A fermented formula in preterm infants: clinical tolerance, gut microbiota, down-regulation of faecal calprotectin and up regulation of faecal secretory IgA. *Br J Nutr* 105: 1843–1851.
45. Korman KS, Loesche WJ (1980) The subgingival microbial flora during pregnancy. *J Periodont Res* 15: 111–122.
46. Dasanayake AP, Li Y, Wiener H, Ruby JD, Lee MJ (2005) Salivary *Actinomyces naeslundii* genospecies 2 and *Lactobacillus casei* levels predict pregnancy outcomes. *J Periodontol* 76: 171–177.
47. Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP (2002) Possible association between amniotic fluid microorganism infection and microflora in the mouth. *Br J Obstet Gynaecol* 109: 527–533.

Supporting Information Legends

Table S1A1. Normalized hybridization signal for all 23 Level 1 (phylum-like) phylogenetic groups targeted by the HITChip.

Phylum-like taxa	M1	F1	M2	F2	M3	F3	M4	F4	M5	F5	F6	M7	F7
<i>Actinobacteria</i>	54200	664363	3558	2587	7101	3596	26451	656165	405151	487047	8858	62346	3777
<i>Asteroleplasma</i>	0	2	27	0	0	3	0	9	0	2	3	0	0
<i>Bacilli</i>	499732	37086	483222	73067	341342	72692	484197	171829	68780	91964	396274	446503	1025083
<i>Bacteroidetes</i>	11003	5519	3816	254266	1012	5987	1196	18570	1464	8414	1839	68952	1870
<i>Clostridium</i> cluster I	6682	169695	274	166	323	411114	883	74423	40667	30246	1692	1865	243
<i>Clostridium</i> cluster III	88	3	1	1	40	0	65	65	6	0	71	187	15
<i>Clostridium</i> cluster IV	46299	16700	18604	9910	1775	3948	3836	11887	6291	7844	13746	1555	54575
<i>Clostridium</i> cluster IX	0	135	0	28	0	31926	56	228399	1	77	67011	277	294
<i>Clostridium</i> cluster XI	586	1163	44	780	445	2579	1312	34491	241	3144	4195	5557	1278
<i>Clostridium</i> cluster XIII	2	1	0	25	5	2	2	14	0	3	154	50	24
<i>Clostridium</i> cluster XIVa	11544	22980	1205	694	2973	946564	2951	7655	8784	2387	16184	4878	176029
<i>Clostridium</i> cluster XV	697	175	2960	656	438	644	1149	716	50	152	3870	465	1196
<i>Clostridium</i> cluster XVI	36	0	18	2	797	153	589	5	0	2	40	14	478
<i>Clostridium</i> cluster XVII	2	0	15	0	0	0	4	0	0	0	5	0	0
<i>Clostridium</i> cluster XVIII	184	67	15	4	1	0	25	34	7	32	52	0	36
<i>Cyanobacteria</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	8	0
<i>Fusobacteria</i>	0	0	0	0	6786	0	3	0	0	0	0	146	2
<i>Lentisphaerae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Proteobacteria</i>	576447	1293526	49516	1192575	224532	503888	231713	1284085	952668	998427	756335	10437	670384
<i>Spirochaetes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uncultured Clostridiales	361	503	32	538	57	125	53	586	137	221	446	4	485
Uncultured Mollicutes	97	3	28	4	39695	799	363	262	3	14	37	202	28
<i>Verrucomicrobia</i>	3408	257	1934	1	144	280	209	110	334	103	0	581	873

M, meconium; F, feces

Table S1A2. Normalized hybridization signal for all 23 Level 1 (phylum-like) phylogenetic groups targeted by the HITChip.

Phylum-like taxa	M8	F9	M10	F10	M11	F11	M12	F12	M13	F13	F14
<i>Actinobacteria</i>	67867	339610	252	13103	6234	1429	8858	2374	79022	682326	31425
<i>Asteroleplasma</i>	0	9	0	8	0	1	15	0	0	0	1
<i>Bacilli</i>	428000	12073	337650	112156	454036	90869	43620	146929	499920	279275	681539
<i>Bacteroidetes</i>	103	13537	88	10402	603	4197	6869	4389	2349	2520	354
<i>Clostridium</i> cluster I	3290	59	14	281	48	155750	105	13571	5055	301765	233
<i>Clostridium</i> cluster III	389	0	20	0	29	6	12	0	351	6	25
<i>Clostridium</i> cluster IV	1334	2893	1878	20417	2120	9356	37219	5602	14110	2421	10317
<i>Clostridium</i> cluster IX	13	0	0	130	15	159043	0	60	17	1030	53
<i>Clostridium</i> cluster XI	8900	43	245	265	215	396	366	599	12945	32074	630
<i>Clostridium</i> cluster XIII	4	0	0	8	0	4	0	17	9	41	48
<i>Clostridium</i> cluster XIVa	6762	4070	16278	7061	14272	25553	31756	7950	12103	6354	9245
<i>Clostridium</i> cluster XV	683	56	831	268	638	170	543	581	1250	1513	6365
<i>Clostridium</i> cluster XVI	0	0	547	0	374	39	3	3	3	13	71
<i>Clostridium</i> cluster XVII	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	1
<i>Clostridium</i> cluster XVIII	0	7	27	0	23	0	0	6	99	62	57
<i>Cyanobacteria</i>	22	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0
<i>Fusobacteria</i>	303	0	7	0	8	0	0	0	526	0	0
<i>Lentisphaerae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Proteobacteria</i>	305	1345765	532	1534471	33539	1202823	1318806	1143457	136961	102917	627245
<i>Spirochaetes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uncultured Clostridiales	10	638	207	320	151	330	1384	340	7	96	304
Uncultured Mollicutes	358	0	44	0	66	181	19	18	671	210	0
<i>Verrucomicrobia</i>	0	29	18	0	1191	18	21	0	27	149	0
M, meconium; F, feces											

Table S2A1. Normalized hybridization signal intensity for all 131 Level 2 (genus-like) phylogenetic groups targeted by the HITChip.

Genus-like taxa	M1	F1	M2	F2	M3	F3	M4	F4	M5	F5	F6	M7	F7
<i>Actinomycetaceae</i>	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aerococcus</i>	3789	515	83	3002	1773	810	6573	3684	149	972	18235	10439	3880
<i>Aeromonas</i>	451	12	0	0	8	0	66	5	55	3	8	15	5
<i>Akkermansia</i>	3408	257	1934	1	144	280	209	110	334	103	0	581	873
<i>Alcaligenes faecalis et rel.</i>	2147	0	34	0	75	0	43	0	69	0	0	53	0
<i>Allistipes et rel.</i>	343	287	817	2788	177	697	195	1931	100	790	172	8063	218
<i>Anaerobiospirillum</i>	1419	462	165	50585	190	17102	102	24413	1007	13590	1075	45	4499
<i>Anaerofustis</i>	507	47	28	440	295	603	790	446	14	96	2845	51	797
<i>Anaerostipes caccae et rel.</i>	91	219	11	130	394	3623	114	820	51	141	196	413	630
<i>Anaerotruncus colihominis et rel.</i>	17	49	156	0	0	88	29	22	3	2	5	0	16
<i>Anaerovorax odorimutans et rel.</i>	0	0	0	0	47	9	0	29	0	0	30	18	6
<i>Aneurinibacillus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aquabacterium</i>	27931	5	730	0	1016	0	4730	2	797	38	0	470	0
<i>Asteroleplasma et rel.</i>	0	2	27	0	0	3	0	9	0	2	3	0	0
<i>Atopobium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	531	0
<i>Bacillus</i>	2887	548	8341	1906	3725	554	4947	2552	480	725	9665	31791	3960
<i>Bacteroides fragilis et rel.</i>	58	380	5	169979	13	647	5	1929	77	853	308	760	223
<i>Bacteroides intestinalis et rel.</i>	0	25	7	71	0	0	0	1	2	7	0	240	0
<i>Bacteroides ovatus et rel.</i>	0	583	0	359	1	8	0	407	125	316	45	1183	4
<i>Bacteroides plebeius et rel.</i>	2	14	18	282	10	1	6	9	4	5	2	1218	1
<i>Bacteroides splachnicus et rel.</i>	412	3349	579	11924	184	4423	50	13586	766	5990	764	4557	1156
<i>Bacteroides stercoris et rel.</i>	27	40	48	15275	3	0	7	19	4	17	0	1135	1
<i>Bacteroides uniformis et rel.</i>	0	5	5	46209	1	0	3	1	0	2	29	623	8
<i>Bacteroides vulgatus et rel.</i>	0	13	11	487	0	0	0	3	2	3	0	9039	0
<i>Bifidobacterium</i>	7593	663698	709	391	2254	2463	6839	554863	403599	486502	668	3430	312
<i>Bilophila et rel.</i>	11	0	24	0	62	0	202	0	37	0	0	58	0
<i>Brachyspira</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bryantella formatexigens et rel.</i>	533	150	40	42	116	24263	205	322	4	4	171	201	46548
<i>Bulleidia moorei et rel.</i>	36	0	14	2	601	83	467	5	0	2	39	14	336
<i>Burkholderia</i>	160520	510	1421	4	2745	44	10104	277	2127	265	19	1605	16
<i>Butyrivibrio crossotus et rel.</i>	1445	45	659	48	104	3347	224	37	105	11	23	333	38750

M, meconium; F, feces

Table S2A2. Normalized hybridization signal intensity for all 131 Level 2 (genus-like) phylogenetic groups targeted by the HITChip.

Genus-like taxa	M8	F9	M10	F10	M11	F11	M12	F12	M13	F13	F14
<i>Actinomycetaceae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aerococcus</i>	18207	208	10	1662	86	894	24	3859	19368	8113	17431
<i>Aeromonas</i>	11	8	0	9	92	9	49	0	34	1	0
<i>Akkermansia</i>	0	29	18	0	1191	18	21	0	27	149	0
<i>Alcaligenes faecalis et rel.</i>	0	0	0	2	68	0	0	0	694	0	0
<i>Allistipes et rel.</i>	23	1539	10	1265	70	477	641	489	183	116	36
<i>Anaerobiospirillum</i>	0	44938	0	23358	92	12862	39	31229	21	610	0
<i>Anaerofustis</i>	11	18	638	198	479	103	0	392	166	1143	4940
<i>Anaerostipes caccae et rel.</i>	242	166	5177	80	4065	73	448	105	359	1045	230
<i>Anaerotruncus colihominis et rel.</i>	0	2	28	1	39	1	19	0	0	20	3
<i>Anaerovorax odorimutans et rel.</i>	51	0	15	0	31	4	25	2	31	1	11
<i>Aneurinibacillus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aquabacterium</i>	11	27	0	24	658	0	35	0	4896	2	0
<i>Asteroleplasma et rel.</i>	0	9	0	8	0	1	15	0	0	0	1
<i>Atopobium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus</i>	50278	141	189	1201	746	594	287	2315	45277	4752	18278
<i>Bacteroides fragilis et rel.</i>	1	1497	4	1167	7	411	485	457	22	194	20
<i>Bacteroides intestinalis et rel.</i>	0	0	0	0	5	0	0	0	36	16	0
<i>Bacteroides ovatus et rel.</i>	0	84	0	11	0	8	8	0	3	375	34
<i>Bacteroides plebeius et rel.</i>	2	4	0	4	1	2	6	1	9	6	1
<i>Bacteroides splachnicus et rel.</i>	14	10079	24	7711	72	2726	3205	3065	232	1488	158
<i>Bacteroides stercoris et rel.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	17	31	0
<i>Bacteroides uniformis et rel.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	11	3	0
<i>Bacteroides vulgatus et rel.</i>	4	0	0	0	22	0	0	0	92	8	0
<i>Bifidobacterium</i>	35	339303	54	12110	2008	923	1207	529	2382	679266	1495
<i>Bilophila et rel.</i>	0	0	0	9	17	0	1	0	576	2	2
<i>Brachyspira</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bryantella formatexigens et rel.</i>	202	5	2101	19	1645	97	151	19	379	207	172
<i>Bulleidia moorei et rel.</i>	0	0	434	0	286	22	3	3	3	12	64
<i>Burkholderia</i>	63	135	2	451	2371	36	238	2	17768	455	3
<i>Butyrivibrio crossotus et rel.</i>	8	36	3080	22	3175	62	121	23	28	14	16
M, meconium; F, feces											

Table S2B1. Normalized hybridization signal intensity for all 131 Level 2 (genus-like) phylogenetic groups targeted by the HITChip.

Genus-like taxa	M1	F1	M2	F2	M3	F3	M4	F4	M5	F5	F6	M7	F7	
<i>Campylobacter</i>	43	0	0	0	0	601	5	13	2	2	0	0	27	0
<i>Catenibacterium mitsuokai et rel.</i>	2	0	15	0	0	0	0	4	0	0	0	5	0	0
<i>Clostridia</i>	6682	169695	274	166	323	411114	883	74423	40667	30246	1692	1865	243	0
<i>Clostridium cellulosi et rel.</i>	1286	86	412	53	25	421	75	73	21	19	198	188	953	0
<i>Clostridium colinum et rel.</i>	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	272	0
<i>Clostridium difficile et rel.</i>	548	306	36	780	396	924	1308	33382	54	2951	4148	5488	1269	0
<i>Clostridium felsineum et rel.</i>	38	857	7	0	1	1645	4	1079	187	193	17	51	3	0
<i>Clostridium leptum et rel.</i>	12115	351	4616	290	760	1872	894	670	220	83	9306	269	556	0
<i>Clostridium nexile et rel.</i>	143	189	5	9	22	220470	18	214	47	18	5	17	86	0
<i>Clostridium orbiscindens et rel.</i>	17593	55	6517	16	344	74	1254	4	254	14	28	414	30498	0
<i>Clostridium ramosum et rel.</i>	179	0	9	4	1	0	25	7	0	0	52	0	36	0
<i>Clostridium sphenoides et rel.</i>	233	19	6	7	27	568	41	4	1	0	28	34	14147	0
<i>Clostridium stercorarium et rel.</i>	88	3	1	1	40	0	65	65	6	0	71	187	15	0
<i>Clostridium symbiosum et rel.</i>	4921	180	183	37	1216	40298	1237	731	196	182	56	1052	3672	0
<i>Clostridium thermocellum et rel.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Collinsella</i>	385	136	90	314	480	124	431	232	88	87	711	9370	224	0
<i>Coprobacillus cateniformis et rel.</i>	5	67	5	0	0	0	0	27	7	32	0	0	0	0
<i>Coprococcus eutactus et rel.</i>	828	11	24	21	53	2082	152	4	3	1	42	433	40537	0
<i>Corynebacterium</i>	447	44	12	13	9	135	117	25231	12	20	151	163	0	0
<i>Desulfovibrio et rel.</i>	0	0	0	83	0	10	0	1390	0	0	604	10	2	0
<i>Dialister</i>	0	0	0	0	0	670	0	37	0	6	21	0	4	0
<i>Dorea formicigenerans et rel.</i>	428	181	9	11	56	56452	39	135	10	5	16	75	5492	0
<i>Eggerthella lenta et rel.</i>	23	54	0	32	20	26	56	55	10	31	45	351	19	0
<i>Enterobacter aerogenes et rel.</i>	18210	152638	551	5766	25060	67420	4070	34505	105533	33197	161927	402	94839	0
<i>Enterococcus</i>	30134	30806	1448	44469	198333	35431	20932	142077	11650	82186	277987	70887	84801	0
<i>Escherichia coli et rel.</i>	65899	277478	7241	922278	43514	305215	37785	839774	236935	498759	87138	590	172778	0
<i>Eubacterium bifforme et rel.</i>	0	0	4	0	196	70	122	0	0	0	2	0	142	0
<i>Eubacterium cylindroides et rel.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Eubacterium hallii et rel.</i>	121	90	50	165	103	96756	215	281	2	40	1079	20	1027	0
<i>Eubacterium limosum et rel.</i>	190	127	2932	216	142	40	359	271	35	56	1025	414	399	0
<i>Eubacterium rectale et rel.</i>	497	57	7	0	92	72670	154	48	2	0	7	69	1288	0
<i>Eubacterium siraeum et rel.</i>	4	1833	88	0	0	15	322	738	583	1165	16	9	147	0
<i>Eubacterium ventriosum et rel.</i>	27	73	0	0	0	80568	0	59	0	0	0	3	6	0
M, meconium; F, feces														

M, meconium; F, feces

Table S2B2. Normalized hybridization signal intensity for all 131 Level 2 (genus-like) phylogenetic groups targeted by the HITChip.

Genus-like taxa	M8	F9	M10	F10	M11	F11	M12	F12	M13	F13	F14
<i>Campylobacter</i>	12	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
<i>Catenibacterium mitsuokai et rel.</i>	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	1
<i>Clostridia</i>	3290	59	14	281	48	155750	105	13571	5055	301765	233
<i>Clostridium cellulosi et rel.</i>	426	57	48	148	41	34	367	36	953	49	231
<i>Clostridium colinum et rel.</i>	28	0	0	0	0	0	0	0	37	0	0
<i>Clostridium difficile et rel.</i>	8742	43	220	265	176	377	340	596	12761	29694	620
<i>Clostridium felsineum et rel.</i>	108	0	0	0	0	16	0	2	153	2380	0
<i>Clostridium leptum et rel.</i>	46	432	121	19833	285	4936	2089	311	3492	114	9485
<i>Clostridium nexile et rel.</i>	5	14	161	158	153	23	52	8	37	162	20
<i>Clostridium orbiscindens et rel.</i>	21	4	918	52	919	40	213	12	4836	7	43
<i>Clostridium ramosum et rel.</i>	0	0	27	0	23	0	0	6	99	20	57
<i>Clostridium sphenoides et rel.</i>	7	0	675	1	513	24	85	2	12	4	29
<i>Clostridium stercorarium et rel.</i>	389	0	20	0	29	6	12	0	351	6	25
<i>Clostridium symbiosum et rel.</i>	1627	51	476	67	679	1246	261	32	3242	1740	37
<i>Clostridium thermocellum et rel.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Collinsella</i>	291	156	165	221	236	133	357	99	315	74	271
<i>Coprobacillus cateniformis et rel.</i>	0	7	0	0	0	0	0	0	0	43	0
<i>Coprococcus eutactus et rel.</i>	720	0	867	6	693	53	32	9	1136	34	57
<i>Corynebacterium</i>	0	0	0	36	14	0	62	50	80	75	4840
<i>Desulfovibrio et rel.</i>	0	166	0	78	0	234	128	22	0	0	0
<i>Dialister</i>	0	0	0	1	0	5	0	0	0	0	0
<i>Dorea formicigenerans et rel.</i>	91	15	315	9	302	68	163	9	176	30	4
<i>Eggerthella lenta et rel.</i>	17	42	15	44	35	39	56	23	136	29	22
<i>Enterobacter aerogenes et rel.</i>	17	53967	0	410417	1952	78364	226107	84132	24556	6180	139211
<i>Enterococcus</i>	84601	9984	72	94285	1022	30912	638	113418	91048	207671	570530
<i>Escherichia coli et rel.</i>	15	982302	3	491080	2721	479007	239044	581186	2977	48778	37611
<i>Eubacterium bifforme et rel.</i>	0	0	113	0	87	17	0	0	0	1	7
<i>Eubacterium cylindroides et rel.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Eubacterium hallii et rel.</i>	22	5	37	205	33	28	13	143	64	382	1749
<i>Eubacterium limosum et rel.</i>	672	38	192	70	159	67	543	188	1084	371	1425
<i>Eubacterium rectale et rel.</i>	100	0	463	79	430	70	16	0	287	61	44
<i>Eubacterium siraeum et rel.</i>	27	6	132	0	95	0	0	0	29	1757	15
<i>Eubacterium ventriosum et rel.</i>	9	0	16	108	8	0	36	0	4	11	7

M, meconium; F, feces

Table S2C1. Normalized hybridization signal intensity for all 131 Level 2 (genus-like) phylogenetic groups targeted by the HITChip.

Genus-like taxa	M1	F1	M2	F2	M3	F3	M4	F4	M5	F5	F6	M7	F7
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> et rel.	177	0	2	33	2	2	4	9	35	0	8	1	248
<i>Fusobacteria</i>	0	0	0	0	6786	0	0	3	0	0	0	0	146
<i>Gemella</i>	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	1
<i>Granulicatella</i>	4768	1614	88	8213	5157	1495	6719	8692	547	3593	45500	451	10658
<i>Haemophilus</i>	2648	38212	6099	20969	9649	7839	30334	25723	19876	38193	20726	88	10284
<i>Helicobacter</i>	57	0	0	0	806	7	18	2	3	0	0	0	36
<i>Klebsiella pneumoniae</i> et rel.	43706	418724	9866	108754	61718	51302	54212	213365	319827	234329	213227	885	198990
<i>Lachnobacillus bovis</i> et rel.	113	10	0	0	22	20278	21	23	0	0	0	79	390
<i>Lachnospira pectinoschiza</i> et rel.	279	135	126	36	100	60391	195	697	15	91	242	131	384
<i>Lactobacillus cateniformis</i> et rel.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus gasseri</i> et rel.	2896	483	8602	1724	3114	451	8149	2278	469	935	9498	406	56168
<i>Lactobacillus plantarum</i> et rel.	199554	52	453631	288	32534	136	197321	968	46016	285	315	35930	112
<i>Lactobacillus salivarius</i> et rel.	11380	951	2494	4203	3808	1422	174491	4927	479	1835	22127	2412	5756
<i>Lactococcus</i>	99893	8	3527	0	861	0	14401	0	3485	27	0	8280	337
<i>Leminorella</i>	1191	5318	455	118	935	1759	107	232	3541	66	6380	21	1742
<i>Megamonas hypermegale</i> et rel.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Megasphaera elsdenii</i> et rel.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Methylobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Micrococcaceae</i>	1494	308	130	1612	2426	326	2238	1477	234	313	6417	40681	3138
<i>Mitsuokella multiacida</i> et rel.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	254	0
<i>Moraxellaceae</i>	5203	4260	231	2843	303	798	1253	2891	1388	2002	2834	31	2301
<i>Novosphingobium</i>	0	0	42	0	4	101	58	6	0	0	6	0	0
<i>Oceanospirillum</i>	0	273	0	0	0	0	0	127	56	146	0	0	0
<i>Oscillospira guillermoidii</i> et rel.	150	1	1069	29	206	5	57	43	2	3	224	52	40
Outgrouping <i>Clostridium</i> cluster	449	21296	29	138	307	103582	90	3987	8307	1848	14233	151	14646
<i>Oxalobacter formigenes</i> et rel.	34903	41	1008	5	342	141	1432	35	410	34	3	477	634
<i>Papillibacter cinnamivorans</i> et rel.	481	0	3	3	14	0	24	1	0	0	8	16	8842
<i>Parabacteroides distasonis</i> et rel.	2397	244	1315	301	357	92	284	206	107	115	79	3373	65
<i>Peptococcus niger</i> et rel.	0	110	0	0	0	26452	0	76	0	0	0	3	6
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> et rel.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Peptostreptococcus micros</i> et rel.	2	1	0	25	5	2	2	14	0	3	154	50	24

M, meconium; F, feces

Table S2C2. Normalized hybridization signal intensity for all 131 Level 2 (genus-like) phylogenetic groups targeted by the HITChip.

Genus-like taxa	M8	F9	M10	F10	M11	F11	M12	F12	M13	F13	F14
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> et rel.	583	34	18	30	19	0	0	6	267	0	1
<i>Fusobacteria</i>	303	0	7	0	8	0	0	0	526	0	0
<i>Gemella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	86	0	0
<i>Granulicatella</i>	550	786	0	6359	52	3180	23	13782	1642	24088	36168
<i>Haemophilus</i>	12	5720	0	34448	905	19733	28561	27752	494	3493	40011
<i>Helicobacter</i>	16	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> et rel.	40	134631	8	248680	4707	263241	395401	239876	36568	24670	114871
<i>Lachnobacillus bovis</i> et rel.	0	0	1612	0	1409	0	0	0	34	3	7
<i>Lachnospira pectinoschiza</i> et rel.	197	7	539	82	422	64	58	40	344	1105	357
<i>Lactobacillus cateniformis</i> et rel.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus gasseri</i> et rel.	30	196	348	1670	2228	13386	520	3094	1308	5034	13075
<i>Lactobacillus plantarum</i> et rel.	1162	219	155	272	192823	53	38493	83	4132	326	5590
<i>Lactobacillus salivarius</i> et rel.	527	411	9	3308	1544	1745	185	6904	3428	11695	15834
<i>Lactococcus</i>	105	0	153	0	250	46	18	0	41500	0	0
<i>Leminorella</i>	0	2426	0	12703	75	2845	7408	2785	419	28	7867
<i>Megamonas hypermegale</i> et rel.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Megasphaera elsdenii</i> et rel.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Methylobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Micrococcaceae</i>	67336	55	18	541	37	300	172	1086	64210	2694	9901
<i>Mitsuokella multiacida</i> et rel.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Moraxellaceae</i>	0	954	0	3518	146	1924	11438	1648	900	148	1472
<i>Novosphingobium</i>	0	0	0	0	0	15	3	0	0	3	0
<i>Oceanospirillum</i>	0	168	0	0	0	0	0	0	0	149	0
<i>Oscillospira guillermoidii</i> et rel.	149	0	35	8	72	4	15	23	88	70	121
Outgrouping <i>Clostridium</i> cluster	310	3689	163	5789	156	23337	30011	7511	666	1285	6433
<i>Oxalobacter formigenes</i> et rel.	0	11	7	31	974	10	56	1	2601	36	3
<i>Papillibacter cinnamivorans</i> et rel.	0	0	368	1	304	2	7	1	1	2	11
<i>Parabacteroides distasonis</i> et rel.	6	91	3	123	38	115	278	49	704	90	51
<i>Peptococcus niger</i> et rel.	12	0	0	0	2	0	0	0	15	8	4
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> et rel.	0	0	10	0	9	0	0	0	0	0	0
<i>Peptostreptococcus micros</i> et rel.	4	0	0	8	0	4	0	17	9	41	48

M, meconium; F, feces

Table S2D1. Normalized hybridization signal intensity for all 131 Level 2 (genus-like) phylogenetic groups targeted by the HITChip.

Genus-like taxa	M1	F1	M2	F2	M3	F3	M4	F4	M5	F5	F6	M7	F7
<i>Phascolarctobacterium faecium</i> et rel.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Prevotella melaninogenica</i> et rel.	0	12	34	27	11	2	116	61	39	5	24	18409	3
<i>Prevotella oralis</i> et rel.	0	33	8	133	6	0	125	7	47	13	0	2264	0
<i>Prevotella ruminicola</i> et rel.	6	70	0	219	0	0	0	33	9	46	0	339	0
<i>Prevotella tannerae</i> et rel.	6119	30	48	114	69	0	238	33	31	5	0	4313	4
<i>Propionibacterium</i>	44259	116	2617	226	1913	522	16770	74307	1208	94	865	7821	84
<i>Proteus</i> et rel.	8417	17823	47	4080	2864	7121	2124	2326	8854	614	21165	30	6555
<i>Pseudomonas</i>	2553	37824	6125	17607	8801	4803	30784	24678	19805	37977	15086	81	9580
<i>Roseburia intestinalis</i> et rel.	338	0	0	0	4	15346	0	13	0	0	0	13	5277
<i>Ruminococcus bromii</i> et rel.	26	2	50	20	11	0	45	25	0	2	120	0	57
<i>Ruminococcus callidus</i> et rel.	71	8	179	7	2	3	118	10	0	1	19	5	26
<i>Ruminococcus gnavus</i> et rel.	133	210	7	26	29	84464	18	175	14	20	30	12	53
<i>Ruminococcus lactaris</i> et rel.	10	63	0	6	0	60338	1	57	1	4	4	3	27
<i>Ruminococcus obeum</i> et rel.	934	50	52	18	328	1066	227	48	26	23	51	1834	2798
<i>Serratia</i>	1308	19107	3050	8901	4929	3589	15169	12528	9939	19044	11331	45	5231
<i>Sporobacter termitidis</i> et rel.	14351	14314	5487	9450	400	1465	984	10253	5207	6547	3748	353	6782
<i>Staphylococcus</i>	13526	999	1971	7567	26425	637	1048	2736	1214	140	9399	209287	51660
<i>Streptococcus bovis</i> et rel.	21501	287	709	818	4133	9	6333	246	383	134	571	1211	522609
<i>Streptococcus intermedius</i> et rel.	17485	122	479	260	10513	163	8610	1095	694	192	1147	12576	62631
<i>Streptococcus mitis</i> et rel.	65308	413	1344	500	50817	601	34159	2167	3212	543	1001	62253	222061
<i>Subdoligranulum variable</i> et rel.	28	0	25	9	12	0	25	14	0	0	73	0	5643
<i>Sutterella wadsworthia</i> et rel.	116690	2268	3087	1720	8554	2838	13363	2569	3204	1591	2412	2026	1048
<i>Tannerella</i> et rel.	1638	433	916	6088	178	116	166	340	149	248	414	13024	187
Uncultured <i>Bacteroides</i>	1	2	5	9	4	1	0	4	2	1	1	411	0
Uncultured <i>Chroococcales</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	8	0
Uncultured <i>Clostridiales</i> I	0	0	0	0	7	0	0	0	0	3	0	0	0
Uncultured <i>Clostridiales</i> II	361	503	32	538	49	125	53	586	137	218	446	4	485
Uncultured <i>Mollicutes</i>	97	3	28	4	39695	799	363	262	3	14	37	202	28
Uncultured <i>Selenomonadaceae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Veillonella</i>	0	25	0	28	0	4804	56	228286	1	71	66979	21	284
<i>Vibrio</i>	12558	64041	8185	23633	9178	10095	17682	31561	32576	31508	33155	2456	23824
<i>Victivallis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Weissella</i> et rel.	26584	290	505	120	151	30984	474	407	3	395	828	577	450
<i>Wissella</i> et rel.	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Xanthomonadaceae</i>	58690	477	664	25	862	2204	3458	174	579	115	647	536	327
M, meconium; F, feces			192	25205	42317	21495	4603	67499	186051	86955	178593	451	137727

Table S2D2 . Normalized hybridization signal intensity for all 131 Level 2 (genus-like) phylogenetic groups targeted by the HITChip.

Genus-like taxa	M8	F9	M10	F10	M11	F11	M12	F12	M13	F13	F14
<i>Phascolarctobacterium faecium</i> et rel.	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Prevotella melaninogenica</i> et rel.	14	13	16	15	159	14	22	1	157	0	3
<i>Prevotella oralis</i> et rel.	1	0	25	0	163	0	0	0	19	23	0
<i>Prevotella ruminicola</i> et rel.	0	8	0	0	0	0	0	0	53	56	0
<i>Prevotella tannerae</i> et rel.	0	0	0	0	30	0	0	0	484	10	0
<i>Protonibacterium</i>	188	54	0	151	3904	34	7003	587	11899	188	14897
<i>Proteus</i> et rel.	0	7731	0	45729	349	22592	38032	9178	360	107	24845
<i>Pseudomonas</i>	12	5465	0	25059	1017	17698	26215	25869	538	3452	34095
<i>Roseburia intestinalis</i> et rel.	0	0	446	0	358	0	0	0	0	0	2
<i>Ruminococcus bromii</i> et rel.	0	2	71	4	64	2	17	29	0	70	228
<i>Ruminococcus callidus</i> et rel.	5	4	84	5	76	9	59	3	28	8	22
<i>Ruminococcus gnavus</i> et rel.	8	44	14	385	20	70	172	27	31	30	22
<i>Ruminococcus lactaris</i> et rel.	0	12	90	19	84	18	55	6	4	9	0
<i>Ruminococcus obeum</i> et rel.	3184	25	47	31	128	320	82	16	5263	229	59
<i>Serratia</i>	6	2867	0	18691	459	9935	14486	13186	222	1742	20989
<i>Sporobacter termitidis</i> et rel.	71	2352	20	333	168	4326	34422	5174	4392	305	74
<i>Staphylococcus</i>	268432	90	87	2278	630	160	713	408	266490	1028	982
<i>Streptococcus bovis</i> et rel.	907	23	1303	620	2432	3829	389	308	3815	1510	1239
<i>Streptococcus intermedius</i> et rel.	662	1	124629	55	103351	3408	443	94	3627	2662	1480
<i>Streptococcus mitis</i> et rel.	2445	12	210120	243	148470	10901	1887	115	11615	6676	319
<i>Subdoligranulum variable</i> et rel.	6	0	35	1	36	2	10	6	26	20	83
<i>Sutterella wadsworthia</i> et rel.	61	2408	491	19917	3336	23586	3823	1282	16175	1647	2832
<i>Tannerella</i> et rel.	36	219	7	104	35	443	2220	327	326	106	50
Uncultured <i>Bacteroides</i>	1	2	0	2	0	1	3	0	0	0	1
Uncultured <i>Chroococcales</i>	22	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0
Uncultured Clostridiales I	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0
Uncultured Clostridiales II	10	638	207	320	151	330	1377	340	7	96	304
Uncultured <i>Mollicutes</i>	358	0	44	0	66	181	19	18	671	210	0
Uncultured <i>Selenomonadaceae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Veillonella</i>	0	0	0	130	14	159038	0	60	0	1023	49
<i>Vibrio</i>	14	13036	5	45901	6425	30260	88393	32626	1414	2764	38134
<i>Victivallis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Weissella</i> et rel.	93	2	575	203	401	21760	1	2549	6582	5720	612
<i>Wissella</i> et rel.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Xanthomonadaceae</i>	6	283	1	24985	1025	405	3400	229	7723	60	62
<i>Yersinia</i> et rel.	10	88521	15	129381	6143	240069	235951	92452	18028	8590	165238

M, meconium; F, feces

Table S3A1. Associations between demographic and clinical data and the presence of the isolated genera or microbial group during at least two weeks in the analyzed assessed using Fisher's tests.

	<i>Staphylococcus</i>			<i>Enterococcus</i>			<i>Streptococcus</i>		
	Meconium Frequency (%)*	P value	Feces Frequency (%)	Meconium Frequency (%)	P value	Feces Frequency (%)	Meconium Frequency (%)	P value	Feces Frequency (%)
Gestational age (wk)	24-26 (n=4)	0.790	21.43	0.760	7.14	0.253	21.43	0.250	14.29
	27-30 (n=4)		14.29		21.43		0.00		0.00
	>30 (n=6)		35.71		7.14		7.14		0.00
Delivery mode	Cesarean section (n=7)	0.500	35.71	0.720	21.43	0.500	42.86	0.499	7.14
	Vaginal (n=7)		35.71		14.29		14.29		0.00
Birth weight (g)	<1000 (n=4)	0.359	21.43	0.131	7.14	1.000	21.43	0.286	14.29
	1000-1500 (n=5)		14.29		14.29		0.00		0.00
	>1500 (n=5)		35.71		14.29		7.14		0.00
Antibiotherapy (days)	> 3 (n=7)	0.143	35.71	0.720	21.43	0.500	42.86	0.499	14.29
	< 3 (n=7)		35.71		14.29		7.14		0.00
Parenteral nutrition (days)	0 (n=3)	0.111	21.43	0.595	7.14	1.000	21.43	0.571	7.14
	0-5 (n=6)		28.57		14.29		0.00		0.00
	> 5 (n=5)		21.43		14.29		14.29		0.00
Nasogastric feeding tube (days)	< 50 (n=9)	0.296	50.00	0.454	7.14	0.238	64.29	0.357	7.14
	> 50 (n=5)		21.43		28.57		14.29		0.00
Mechanical ventilation	Yes (n=7)	0.143	42.86	0.279	21.43	0.500	42.86	0.499	14.29
	No (n=7)		28.57		14.29		7.14		0.00
Hospital stay (days)	< 35 (n=5)	0.500	28.57	0.545	7.14	0.378	35.71	0.642	7.14
	> 35 (n=9)		42.86		28.57		14.29		0.00
Meconium expulsion (h)	< 12 (n=7)	0.500	35.71	0.720	14.29	0.500	50.00	0.499	7.14
	> 12 (n=7)		35.71		21.43		14.29		0.00
Type of feeding	Breast-fed (n=7)	0.500	28.57	0.279	21.43	0.500	42.86	0.499	14.29
	Mixed-fed (n=7)		42.86		14.29		50.00		0.00

Table S3A2. Associations between demographic and clinical data and the presence of the isolated genera or microbial group during at least two weeks in the analyzed assessed using Fisher's tests.

	<i>Lactobacillus</i>			<i>Bifidobacterium</i>			Other G+		
	Meconium Frequency (%)	<i>P</i> value	Feces Frequency (%)	Meconium Frequency (%)	<i>P</i> value	Feces Frequency (%)	Meconium Frequency (%)	<i>P</i> value	Feces Frequency (%)
Gestational age (wk)	7.14 14.29 0.00	0.209	0.00 7.14 14.29	0.00 0.00 0.00	0.736	0.00 0.00 0.00	1.000 1.000 1.000	1.000 1.000 1.000	0.00 0.00 0.00
Delivery mode	14.29 7.14	0.500	7.14 14.29	0.00 0.00	0.500	0.00 0.00	1.000 1.000	0.499 0.769	0.00 0.00
Birth weight (g)	7.14 7.14 7.14	1.000	0.00 7.14 14.29	0.00 0.00 0.00	0.725	0.00 0.00 0.00	1.000 1.000 1.000	0.725 0.725 0.725	0.00 0.00 0.00
Antibiotherapy (days)	21.43 0.00	0.096	7.14 14.29	0.00 0.00	0.500	0.00 0.00	1.000 1.000	0.499 0.769	0.00 0.00
Parenteral nutrition (days)	0.00 14.29 7.14	0.753	7.14 14.29 0.00	0.00 0.00 0.00	0.382	0.00 0.00 0.00	1.000 1.000 1.000	1.000 1.000 1.000	0.00 0.00 0.00
Nasogastric feeding tube (days)	7.14 14.29	0.615	14.29 7.14	0.00 0.00	0.725	0.00 0.00	1.000 1.000	0.643 0.308	0.00 0.00
Mechanical ventilation	21.43 0.00	0.096	14.29 7.14	0.00 0.00	0.500	0.00 0.00	1.000 1.000	0.499 0.769	0.00 0.00
Hospital stay (days)	21.43 0.00	0.231	14.29 7.14	0.00 0.00	0.275	0.00 0.00	1.000 1.000	0.357 0.604	0.00 0.00
Meconium expulsion (h)	7.14 14.29	0.500	14.29 7.14	0.00 0.00	0.500	0.00 0.00	1.000 1.000	0.499 0.769	0.00 0.00
Type of feeding	14.29 7.14	0.500	14.29 7.14	0.00 0.00	0.500	0.00 0.00	1.000 1.000	0.499 0.231	0.00 0.00

Table S3A3. Associations between demographic and clinical data and the presence of the isolated genera or microbial group during at least two weeks in the analyzed assessed using Fisher's tests.

	<i>Klebsiella</i>						<i>Serratia</i>						<i>E. coli</i>					
	Meconium			Feces			Meconium			Feces			Meconium			Feces		
	Frequency (%)	P value		Frequency (%)	P value		Frequency (%)	P value		Frequency (%)	P value		Frequency (%)	P value		Frequency (%)	P value	
Gestational age (wk)																		
	0.00	1.000	24-26 (n=4)	14.29	0.999	0.00	0.00	1.000	21.43	0.020	0.00	1.000	0.00	1.000	14.29	0.481		
	0.00		27-30 (n=4)	21.43		0.00	0.00		21.43		0.00		0.00		14.29			
	7.14		>30 (n=6)	28.57		0.00	0.00		0.00		0.00		0.00		35.71			
Delivery mode			Cesarean section (n=7)	35.71	0.500	0.00	0.00	1.000	21.43	0.703	0.00	1.000	0.00	1.000	35.71			
	7.14		Vaginal (n=7)	28.57		0.00	0.00		21.43		0.00		0.00		28.57		0.499	
Birth weight (g)			<1000 (n=4)	14.29	0.999	0.00	0.00	1.000	21.43	0.334	0.00	1.000	0.00	1.000	14.29		0.151	
	7.14		1000-1500 (n=5)	21.43		0.00	0.00		14.29		0.00		0.00		14.29			
	0.00		>1500 (n=5)	28.57		0.00	0.00		7.14		0.00		0.00		35.71			
Antibiotherapy (days)			> 3 (n=7)	42.86	0.500	0.00	0.00	1.000	42.86	0.002	0.00	1.000	0.00	1.000	21.43		0.133	
	7.14		< 3 (n=7)	35.71		0.00	0.00		0		0.00		0.00		42.86			
Parenteral nutrition (days)			0 (n=3)	14.29	1.000	0.00	0.00	1.000	0.00	0.112	0.00	1.000	0.00	1.000	14.29		0.413	
	7.14		0-5 (n=6)	35.71		0.00	0.00		14.29		0.00		0.00		35.71			
	0.00		> 5 (n=5)	14.29		0.00	0.00		28.57		0.00		0.00		14.29			
Nasogastric feeding tube (days)			< 50 (n=9)	50.00	0.571	0.00	0.00	1.000	14.29	0.060	0.00	1.000	0.00	1.000	50.00		0.202	
	7.14		> 50 (n=5)	14.29		0.00	0.00		28.57		0.00		0.00		14.29			
Mechanical ventilation			Yes (n=7)	35.71	0.500	0.00	0.00	1.000	35.71	0.050	0.00	1.000	0.00	1.000	28.57		0.499	
	7.14		No (n=7)	28.57		0.00	0.00		7.14		0.00		0.00		35.71			
Hospital stay (days)			< 35 (n=5)	28.57	0.357	0.00	0.00	1.000	0.00	0.027	0.00	1.000	0.00	1.000	28.57		0.378	
	0.00		> 35 (n=9)	35.71		0.00	0.00		42.86		0.00		0.00		35.71			
Meconium expulsion (h)			< 12 (n=7)	35.71	0.500	0.00	0.00	1.000	14.29	0.296	0.00	1.000	0.00	1.000	35.71		0.499	
	0.00		> 12 (n=7)	28.57		0.00	0.00		28.57		0.00		0.00		28.57			
Type of feeding			Breast-fed (n=7)	0.50	0.500	0.00	0.00	1.000	14.29	0.296	0.00	1.000	0.00	1.000	42.86		0.133	
	0.00		Mixed-fed (n=7)	14.29		0.00	0.00		28.57		0.00		0.00		21.43			

Table S3A4. Associations between demographic and clinical data and the presence of the isolated genera or microbial group during at least two weeks in the analyzed assessed using Fisher's tests.

		Other G-			Yeast		
		Meconium Frequency (%)	<i>P</i> value	Feces Frequency (%)	Meconium Frequency (%)	Feces Frequency (%)	<i>P</i> value
Gestational age (wk)	24-26 (n=4)	7.14	0.571	0.00	1.000	0.00	0.571
	27-30 (n=4)	0.00		0.00		7.14	
	>30 (n=6)	0.00		7.14		0.00	
Delivery mode	Cesarean section (n=7)	7.14	0.500	0.00	0.499	7.14	0.500
	Vaginal (n=7)	0.00		7.14		0.00	
Birth weight (g)	<1000 (n=4)	7.14	0.286	0.00	0.999	0.00	1.000
	1000-1500 (n=5)	0.00		0.00		0.00	
	>1500 (n=5)	0.00		7.14		7.14	
Antibiotherapy (days)	> 3 (n=7)	7.14	0.500	0.00	0.499	7.14	0.500
	< 3 (n=7)	0.00		7.14		0.00	
	0 (n=3)	0.00	0.571	7.14	0.214	0.00	1.000
Parenteral nutrition (days)	0-5 (n=6)	0.00		0.00		7.14	
	> 5 (n=5)	7.14		0.00		0.00	
Nasogastric feeding tube (days)	< 50 (n=9)	0.00	0.571	7.14	0.643	0.00	0.571
	> 50 (n=5)	7.14		0.00		7.14	
Mechanical ventilation	Yes (n=7)	7.14	0.500	7.14	0.499	7.14	0.500
	No (n=7)	0.00		0.00		0.00	
Hospital stay (days)	< 35 (n=5)	0.00	0.643	7.14	0.357	0.00	0.643
	> 35 (n=9)	7.14		0.00		7.14	
Meconium expulsion (h)	< 12 (n=7)	0.00	0.500	7.14	0.499	0.00	0.500
	> 12 (n=7)	7.14		0.00		7.14	
Type of feeding	Breast-fed (n=7)	7.14	0.500	7.14	0.499	0.00	0.500
	Mixed-fed (n=7)	0.00		0.00		7.14	
n, number of samples.							

*Percentage of samples where a genus or microbial group was isolated at least two weeks.

Significant associations are underlined (*P* values ≤ 0.05).

Table S4. Dominant phylotypes in meconium and 3rd week fecal samples detected by HITChip.

Species-like phylotype	Meconium samples					3 rd week fecal samples																				
	n	1	2	3	4	5	7	8	10	11	12	13	n	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	14
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	0.93	0.57	1.64	2.29	5.27	0.03	0.00	0.00	0.14	7.60	1.83	12	4.83	1.70	1.14	1.90	3.37	4.68	2.90	1.61	7.19	2.87	4.90	0.47	1.38
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	1.98	0.07	9.07	1.35	0.57	0.37	0.08	0.00	0.05	0.01	1.24	11	1.02	1.91	0.35	2.00	3.05	11.74	2.71	0.45	4.93	1.58	7.13	6.97	2.77
<i>Escherichia coli</i>	3	2.14	0.06	1.61	0.38	2.01	0.01	0.00	0.00	0.11	0.41	0.01	10	0.79	20.44	6.70	9.90	8.83	0.91	2.32	17.19	8.67	7.04	14.80	1.06	0.00
<i>Hafnia alvei</i>	5	0.74	0.08	6.31	0.54	10.54	0.07	0.00	0.00	1.18	11.02	2.26	10	9.23	0.13	0.70	1.81	4.13	12.96	6.43	3.64	5.50	12.98	4.80	0.49	11.17
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	4	0.80	0.57	2.86	2.28	5.15	0.04	0.00	0.00	0.28	5.63	0.74	11	4.41	1.63	0.33	2.11	3.63	3.79	2.25	1.97	1.91	4.11	4.18	0.42	2.75
<i>Lactobacillus fermentum</i>	8	9.74	1.96	2.78	11.91	1.84	3.13	0.08	0.02	24.08	1.40	0.21	0	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Lactobacillus reuteri</i>	3	0.54	44.89	0.38	4.00	0.12	0.21	0.01	0.00	1.03	0.10	0.04	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Serratia liquefaciens</i>	4	0.79	0.57	2.81	2.27	4.91	0.04	0.00	0.00	0.28	5.22	0.73	11	4.18	1.63	0.31	2.11	3.63	3.62	2.18	1.84	1.58	4.02	3.99	0.42	2.51
<i>Shigella dysenteriae</i>	2	0.61	0.05	0.68	0.10	3.52	0.03	0.00	0.00	0.05	4.86	0.10	11	3.40	6.64	1.24	4.16	4.58	1.40	1.74	5.45	2.60	4.30	6.15	0.50	0.00
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5	1.12	0.35	3.86	0.14	0.08	34.57	51.66	0.02	0.12	0.05	34.62	1	0.05	0.28	0.03	0.11	0.01	0.74	2.66	0.01	0.13	0.01	0.03	0.07	0.07
<i>Streptococcus viridans</i>	6	1.87	0.05	7.21	3.60	0.15	9.95	0.27	58.37	28.43	0.08	0.65	1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Unc. <i>Streptococcus</i> sp. NB4D2	4	0.39	0.02	1.48	0.85	0.02	1.96	0.03	34.61	19.94	0.02	0.10	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Total contribution		21.66	49.23	40.67	29.71	34.19	50.40	52.14	93.03	75.68	36.40	42.55		27.91	34.38	10.80	24.10	31.22	39.84	25.19	32.16	32.52	36.92	45.99	10.41	20.66

n, number of samples were the phylotype contribute, at least, 1% of the hybridization's signal

Table S5. Proteobacterial phylotypes detected in meconium and 3rd week fecal samples using HITChip technique.

Species-like phylotype	Meconium samples													3 rd week fecal samples													
	n	1	2	3	4	5	7	8	10	11	12	13	n	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	14	
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2	0.36	0.03	0.52	0.08	2.04	0.01	0.00	0.00	0.03	1.71	0.04	9	1.51	4.26	0.93	3.18	2.47	0.65	1.27	6.67	2.96	3.47	2.60	0.30	0.00	
<i>Citrobacter braakii</i>	1	0.17	0.01	0.33	0.05	0.40	0.01	0.00	0.00	0.03	1.92	0.33	3	0.57	0.05	0.52	0.06	0.05	1.56	0.40	0.25	3.28	0.39	0.55	0.03	1.73	
<i>Citrobacter farneri</i>	2	0.23	0.01	0.29	0.04	1.46	0.01	0.00	0.00	0.01	1.71	0.04	8	1.29	2.54	0.45	2.14	1.97	0.54	0.41	2.44	1.25	1.81	1.80	0.20	0.00	
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0.16	0.01	0.27	0.05	0.16	0.01	0.00	0.00	0.03	1.52	0.33	3	0.34	0.05	0.50	0.06	0.05	1.39	0.33	0.12	2.95	0.31	0.36	0.03	1.49	
<i>Citrobacter murliniae</i>	1	0.17	0.01	0.33	0.05	0.40	0.01	0.00	0.00	0.03	1.92	0.33	3	0.57	0.05	0.52	0.06	0.05	1.56	0.40	0.25	3.28	0.39	0.55	0.03	1.73	
<i>Citrobacter sedlakii</i>	0	0.26	0.01	0.35	0.05	0.60	0.01	0.00	0.00	0.03	0.36	0.01	8	0.31	4.29	1.01	2.79	1.75	0.24	0.36	5.16	2.51	1.97	2.54	0.19	0.00	
<i>Citrobacter werkmanii</i>	1	0.13	0.01	0.29	0.02	0.30	0.01	0.00	0.00	0.02	1.72	0.33	3	0.40	0.08	0.53	0.07	0.04	1.24	0.26	0.26	4.56	0.32	0.37	0.03	1.56	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	0.17	0.02	1.60	0.07	1.73	0.01	0.00	0.00	0.17	1.78	0.06	6	1.41	0.02	0.13	0.40	0.73	1.76	0.88	0.75	1.31	1.43	1.08	0.06	1.77	
<i>Enterobacter cloacae</i> *	5	0.93	0.57	1.64	2.29	5.27	0.03	0.00	0.00	0.14	7.60	1.83	12	4.83	1.70	1.14	1.90	3.37	4.68	2.90	1.61	7.19	2.87	4.90	0.47	1.38	
<i>Escherichia coli</i> *	3	2.14	0.06	1.61	0.38	2.01	0.01	0.00	0.00	0.11	0.41	0.01	10	0.79	20.44	6.70	9.90	8.83	0.91	2.32	17.19	8.67	7.04	14.80	1.06	0.00	
<i>Escherichia fergusonii</i>	0	0.61	0.02	0.69	0.11	0.94	0.01	0.00	0.00	0.06	0.41	0.01	8	0.37	8.03	2.10	3.75	3.24	0.32	0.70	6.93	3.32	2.78	5.29	0.36	0.00	
<i>Hafnia alvei</i> *	5	0.74	0.08	6.31	0.54	10.54	0.07	0.00	0.00	1.18	11.02	2.26	10	9.23	0.13	0.70	1.81	4.13	12.96	6.43	3.64	5.50	12.98	4.80	0.49	11.17	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	0.68	0.03	2.11	0.27	4.25	0.03	0.00	0.00	0.20	4.32	0.71	10	3.33	1.06	0.19	1.61	2.46	3.06	1.94	1.68	0.90	3.51	3.02	0.30	1.30	
<i>K pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i> *	4	0.80	0.57	2.86	2.28	5.15	0.04	0.00	0.00	0.28	5.63	0.74	11	4.41	1.63	0.33	2.11	3.63	3.79	2.25	1.97	1.91	4.11	4.18	0.42	2.75	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0.11	0.54	0.69	2.03	0.67	0.01	0.00	0.00	0.09	0.90	0.03	2	0.85	0.57	0.12	0.49	1.16	0.56	0.25	0.16	0.68	0.52	0.97	0.12	1.20	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	0.11	0.54	0.71	2.05	0.67	0.01	0.00	0.00	0.11	0.91	0.04	2	0.85	0.57	0.13	0.50	1.16	0.63	0.25	0.16	0.79	0.56	0.98	0.12	1.29	
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	2	0.26	0.00	0.32	0.05	1.33	0.00	0.00	0.00	0.02	2.49	0.06	8	1.15	4.27	0.71	2.44	1.72	0.48	0.51	4.89	2.31	2.22	2.83	0.20	0.00	
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	0	0.04	0.00	0.06	0.01	0.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.01	1	0.16	0.79	0.19	0.61	0.33	0.07	0.04	1.39	0.70	0.62	0.31	0.06	0.00	
<i>Serratia liquefaciens</i> *	4	0.79	0.57	2.81	2.27	4.91	0.04	0.00	0.00	0.28	5.22	0.73	11	4.18	1.63	0.31	2.11	3.63	3.62	2.18	1.84	1.58	4.02	3.99	0.42	2.51	
<i>Serratia marcescens</i>	2	0.11	0.54	0.79	2.01	0.67	0.01	0.00	0.00	0.09	1.00	0.03	2	0.86	0.58	0.18	0.50	1.17	0.89	0.27	0.17	1.10	0.60	0.99	0.12	1.53	
<i>Shigella dysenteriae</i> *	2	0.61	0.05	0.68	0.10	3.52	0.03	0.00	0.00	0.05	4.86	0.10	11	3.40	6.64	1.24	4.16	4.58	1.40	1.74	5.45	2.60	4.30	6.15	0.50	0.00	
<i>Yersinia bercovieri</i>	1	0.11	0.00	0.18	0.03	0.69	0.00	0.00	0.00	0.01	1.30	0.02	0	0.67	0.92	0.21	0.51	0.55	0.36	0.26	0.94	0.69	0.65	0.98	0.05	0.25	
<i>Yersinia frederiksenii</i>	1	0.06	0.00	0.13	0.02	0.60	0.00	0.00	0.00	0.01	1.05	0.02	0	0.58	0.30	0.06	0.20	0.33	0.31	0.18	0.24	0.37	0.39	0.53	0.03	0.25	
<i>Yersinia rohdei</i>	1	0.07	0.00	0.12	0.02	0.70	0.00	0.00	0.00	0.00	2.91	0.06	2	1.00	0.30	0.12	0.20	0.33	0.43	0.23	0.32	1.06	0.53	0.67	0.03	0.41	
Total contribution		9.82	3.70	25.69	14.88	49.24	0.35	0.02	0.01	2.97	62.82	8.13		43.08	60.91	18.99	41.57	47.72	43.41	26.76	64.51	61.45	57.78	65.26	5.65	32.33	
n, number of samples were a given phylotype contribute for, at least, 1% of the hybridization's signals. *Dominant phylotypes in meconium and 3 rd week fecal samples.																											

n, number of samples were a given phylotype contribute for, at least, 1% of the hybridization's signals. *Dominant phylotypes in meconium and 3rd week fecal samples.

Table S6. Lactobacilli and lactococci phylotypes detected in meconium and 3rd week fecal samples using HITChip technique.

Species-like phylotype	Meconium samples													3 rd week fecal samples												
	n	1	2	3	4	5	7	8	10	11	12	13	n	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	14
<i>Lactobacillus antri</i>	2	0.95	0.83	0.30	1.28	0.15	0.45	0.02	0.00	1.95	0.20	0.03	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Lactobacillus fermentum</i> *	8	9.74	1.96	2.78	11.91	1.84	3.13	0.08	0.02	24.08	1.40	0.21	0	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Lactobacillus gasseri</i>	0	0.00	0.04	0.06	0.18	0.00	0.02	0.00	0.04	0.09	0.00	0.07	1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.46	0.00	0.00	0.41	0.00	0.00	0.00
<i>Lactobacillus gastricus</i>	4	1.02	2.54	0.33	1.88	0.16	0.46	0.02	0.00	2.16	0.21	0.03	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	0	0.00	0.03	0.05	0.16	0.00	0.02	0.00	0.04	0.09	0.00	0.06	1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.29	0.00	0.00	0.35	0.00	0.00	0.00
<i>Lactobacillus lactis</i>	1	0.10	1.36	0.04	0.15	0.02	0.02	0.00	0.01	0.19	0.02	0.00	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
<i>Lactobacillus mucosae</i>	4	2.68	1.13	0.86	4.10	0.57	0.98	0.04	0.01	4.98	0.43	0.07	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Lactobacillus oris</i>	2	0.95	0.82	0.30	1.28	0.15	0.45	0.02	0.00	1.95	0.20	0.03	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Lactobacillus reuteri</i> *	3	0.54	44.89	0.38	4.00	0.12	0.21	0.01	0.00	1.03	0.10	0.04	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Lactobacillus salivarius</i>	1	0.47	0.22	0.30	11.30	0.02	0.19	0.04	0.00	0.15	0.01	0.21	0	0.02	0.14	0.04	0.10	0.06	0.87	0.15	0.01	0.10	0.05	0.26	0.41	0.58
<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salicinius</i>	1	0.47	0.22	0.30	11.30	0.02	0.19	0.04	0.00	0.15	0.01	0.21	0	0.02	0.14	0.04	0.10	0.06	0.87	0.15	0.01	0.10	0.05	0.26	0.41	0.58
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	1	0.04	12.89	0.06	0.32	0.01	0.02	0.00	0.00	0.16	0.01	0.00	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Lactobacillus vaginalis</i> KC19	2	0.54	14.46	0.14	1.21	0.09	0.17	0.00	0.00	0.81	0.10	0.02	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Lactococcus lactis</i>	2	2.29	0.19	0.05	0.76	0.07	0.39	0.01	0.01	0.02	0.00	1.73	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	3	5.91	0.43	0.09	1.14	0.16	0.98	0.01	0.01	0.01	0.00	3.64	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Total contribution		25.69	82.00	6.02	50.97	3.38	7.69	0.28	0.15	37.82	2.69	6.37		0.05	0.28	0.07	0.22	0.12	1.76	3.07	0.02	0.20	0.87	0.52	0.83	1.18

n, number of samples were a given phylotype contribute for, at least, 1% of the hybridization's signals.

*Dominant phylotypes in meconium.

Table S7. Bifidobacterial phylotypes detected in meconium and 3rd week fecal samples using HITChip technique.

Species-like phylotype	Meconium samples													3 rd week fecal samples													
	n	1	2	3	4	5	7	8	10	11	12	13	n	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	14	
<i>Bifidobacterium animalis</i>	1	0.23	0.05	0.04	0.18	1.02	0.15	0.00	0.00	0.08	0.03	0.11	4	1.35	0.00	0.01	1.27	1.23	0.01	0.00	0.59	0.07	0.00	0.00	1.95	0.05	
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	1	0.01	0.01	0.02	0.07	1.55	0.02	0.00	0.00	0.03	0.00	0.01	5	1.43	0.00	0.01	1.08	1.13	0.00	0.00	1.87	0.04	0.00	0.00	2.31	0.00	
<i>Bifidobacterium breve</i>	1	0.03	0.01	0.05	0.09	3.78	0.03	0.00	0.00	0.03	0.00	0.01	5	3.77	0.00	0.02	2.81	4.12	0.00	0.00	1.83	0.04	0.00	0.00	6.39	0.00	
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	1	0.01	0.00	0.03	0.02	4.42	0.04	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	4	4.40	0.00	0.01	3.14	5.12	0.00	0.00	0.17	0.01	0.00	0.00	8.09	0.00	
<i>Bifidobacterium dentium</i>	1	0.01	0.00	0.01	0.03	1.03	0.04	0.00	0.00	0.01	0.02	0.01	4	1.61	0.00	0.01	1.35	1.61	0.01	0.00	0.69	0.18	0.00	0.00	1.92	0.00	
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	0	0.23	0.05	0.03	0.15	0.81	0.13	0.00	0.00	0.08	0.03	0.11	5	1.44	0.00	0.01	1.07	1.23	0.01	0.00	1.33	0.03	0.00	0.00	1.99	0.05	
<i>Bifidobacterium infantis</i>	1	0.03	0.01	0.05	0.09	4.27	0.03	0.00	0.00	0.03	0.00	0.01	5	4.44	0.00	0.02	3.25	4.76	0.00	0.00	3.41	0.07	0.01	0.01	7.50	0.00	
<i>Bifidobacterium longum</i>	1	0.01	0.01	0.03	0.07	1.99	0.02	0.00	0.00	0.03	0.00	0.01	5	2.02	0.00	0.01	1.48	1.71	0.00	0.00	3.45	0.07	0.01	0.00	3.29	0.00	
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	1	0.01	0.01	0.03	0.07	1.96	0.02	0.00	0.00	0.03	0.00	0.01	5	1.98	0.00	0.01	1.46	1.67	0.00	0.00	3.11	0.06	0.01	0.00	3.24	0.00	
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	1	0.01	0.01	0.02	0.07	1.55	0.02	0.00	0.00	0.03	0.00	0.01	5	1.43	0.00	0.01	1.08	1.13	0.00	0.00	1.87	0.04	0.00	0.00	2.31	0.00	
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	1	0.01	0.00	0.01	0.01	2.02	0.03	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	4	1.97	0.00	0.01	1.32	2.11	0.00	0.00	0.07	0.01	0.00	0.00	3.24	0.00	
Unc. <i>Bifidobacterium</i> sp. 15D	0	0.01	0.00	0.01	0.03	0.94	0.02	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	4	1.64	0.00	0.01	1.38	1.47	0.00	0.00	0.65	0.05	0.00	0.00	2.23	0.00	
Total contribution		0.61	0.13	0.34	0.87	25.34	0.56	0.01	0.01	0.38	0.08	0.30		27.46	0.02	0.11	20.68	27.28	0.05	0.02	19.04	0.68	0.05	0.04	44.44	0.11	

n, number of samples were a given phylotype contribute for, at least, 1% of the hybridization's signals.

n, number of samples were a given phylotype contribute for, at least, 1% of the hybridization's signals.

*IV. Colonización intestinal de los recién nacidos prematuros:
efecto de las sondas de alimentación enteral*



*IV. Early gut colonization of preterm infants: effect of
enteral feeding tubes*

*Manuscrito en preparación para
“Journal of Pediatrics Gastroenterology and Nutrition”*

IV. 1. ABSTRACT

Objective: To evaluate the potential role of the enteral feeding systems as a site for colonization by nosocomial bacteria, and, its impact on early gut colonization of preterm neonates.

Methods: Mother's own milk, donor milk and preterm formula samples were obtained after passing through the external part of the enteral feeding tubes and cultured. In addition, meconium and fecal samples from 26 preterm infants were collected at different times until discharge and cultured. Random amplification polymorphism DNA (RAPD) and Pulse field gel electrophoresis (PFGE) were performed to confirm the presence of the same bacterial strains in milk and infant fecal samples.

Results: Approximately 4,000 bacterial isolates were identified at the species level. The dominant species in both preterm feces and milk samples were *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. All of them were present at high concentrations independently of the feeding mode. RAPD and PFGE techniques showed that both type of samples shared numerous bacterial strains. Furthermore, scanning electron microscopy (SEM) revealed the presence of a dense bacterial biofilm in several parts of the feeding tubes and the tube connectors.

Conclusions: There is a direct relationship between the hospital-associated bacterial species that integrated the thick biofilms formed in the feeding tubes and their presence, at high concentrations, in feces of the preterm neonates.

Keywords: hospital's bacteria, biofilms, intestinal composition

What is known:

- Preterm infants are associated to an aberrant intestinal colonization pattern.
- Preterm infants are routinely tube-fed for several days until they are physiologically ready for sucking.
- The inner portion of nasogastric enteral feeding tubes has been shown to be important locus for colonization by NICU-associated microorganisms.

What is new:

- A thick bacterial biofilms is formed inside the external feeding tube and connectors within 24 h contributing to the bacterial composition of the milk that pass through it.
- Sharing of enterobacterial, staphylococcal and enterococcal strains between milk samples collected after their pass through the feeding system and infant feces was observed during hospital stay.

IV. 2. INTRODUCTION

The colonization of the infant gastrointestinal tract (GIT) is an essential process that has important short- and long-term consequences for human health [1]. Many factors affect the acquisition, composition and evolution of the infant gut microbiota, including gestational age, mode of delivery, diet or medical treatments [2]. Preterm infants are frequently associated to an abnormal intestinal colonization pattern during the first weeks of life [3,4], a fact that increases susceptibility to disease [5-7]. Globally, the intestinal microbiota of preterm infants exhibits a significantly reduced bacterial diversity and an abundance of microorganisms usually related to hospital environments [8-10] compared to infants born at term.

Breastfeeding is the natural and best advisable way of supporting the growth and development of healthy term infants [11,12]. When breastfeeding may not be possible and own mother's milk (OMM) may not be available, donor human milk (DM) becomes the next alternative [11,13]. However, in practice, preterm neonates frequently receive a mixed diet regime, including alternating and variable amounts of OMM, DM and/or preterm infant formula, depending on their health status, internal hospital management and availability of human milk during their stay at the neonatal intensive care unit (NICU).

Preterm infants are routinely tube-fed until they are physiologically ready for coordination of sucking, swallowing and breathing, which often occurs at 33-36 weeks of postmenstrual age [14]. Therefore, any type of feed must be applied through a feeding device as long as it is placed in a given neonate. The inner portion of nasogastric enteral feeding tubes (NEFT) has been shown to be important locus for colonization by NICU-associated microorganisms [15-17]. As a consequence, the pass of any nutritional source through the tubes may sweep along bacteria and have a strong impact on the infant intestinal colonization.

In this context, the objective of this work was to evaluate unlike previous studies if the external feeding tube (EFT), which is communicated with the NEFT through a connector device, may also act as a locus for growth of nosocomial bacteria and, then, its impact on early gut colonization of preterm neonates.

IV. 3. METHODS

IV. 3. 1. Subjects and sampling

Thirty-one preterm infants were recruited among those born at the Hospital Universitario 12 de Octubre of Madrid (Spain) from October 2009 to June 2010. The protocol of the study was approved by the Ethical Committee on Clinical Research of the *Hospital Clínico San Carlos* of Madrid (10/017-E) and written informed parental consent was obtained for each preterm before inclusion. To be eligible for enrolment, preterm infants had to be born at a gestational age of ≤ 32 weeks or with birth weight of $\leq 1,200$ g. Neonates with any malformation or suffering from any genetic metabolic disorder were excluded from the study. Of the 31 infants, 5 dropped out from the trial: 2 infants died before the meconium expulsion and the parents of 3 infants revoked the consent.

All infants were fed with human milk (OMM and/or DM) and, occasionally, with preterm formula; however, there was a high individual variability in the specific feeding pattern (Supplemental Table 1- Supplemental Digital Content).

Mother's milk was extracted using electric pump and stored either refrigerated (5 °C) for maximum of 24 h or frozen (-18 °C) up to 6 months. Donor milk is normally pasteurized (62.5°C 30 min) and stored frozen (-18 °C) after collection up to 3 months. The commercial formula milk used in the hospital is already prepared single doses. All milks were incubated during 10-15 min at 37-40°C before administration. Syringe barrels used as reservoirs were connected through an EFT to the infant's NEFT (Figure 1). The 135 feed (OMM: 85; DM: 35 and infant formula: 15) samples analyzed in this study were the last fraction obtained after their circulation through the external feeding tube, immediately before entering the nasogastric tube at the connector level (Figure 1). Feeding tubes were routinely replaced and discarded every 24h, which means that different feed types could pass through the same tube during that period.

First spontaneously evacuated meconium and fecal samples were collected by the medical staff of the Department of Neonatology of the Hospital weekly from the diapers of the infants during their stay at the NICU. All the samples were stored at -20°C until analysis. Routinely non-used diapers were placed inside the incubators to be used as controls.

Details regarding culture analysis, bacterial identification, and genetic relatedness among selected bacteria from mother and infants with RAPD and PFGE, and statistical analysis of microbial composition and clinical data are presented in the supplementary methods document (Supplemental Methods – Supplemental Digital Content).

On the other hand, 6 different NEFT, connectors and EFT were selected from 6 neonates taking into account numerous conditions that could be involved in microbial growth, such as temperature (cot or incubator), last type of feed that passed through the

tube, time that the tube was placed into the neonate or infusion rate (gavage or pump). Bacteria present on the internal surface of these devices were analyzed by SEM as explained in the supplementary methods document (Supplemental Methods – Supplemental Digital Content).

IV. 4. RESULTS

IV. 4. 1. Characteristics of the Infants

Twenty-six infants were included in the study. Their main clinical characteristics are described in Table 1. All of them, except two, received antibacterial prophylaxis at least for the first 3 days of life. Infants were fed either with their OMM, DM and/or formula by NEFT for, at least, 17 days after delivery.

IV. 4. 2. Microbiological characterization of OMM, DM and preterm formula after their pass through the external feeding tubes.

Samples (n=135) of either OMM (n=85), DM (n=35) or infant formula (n=15) were taken after their passage through the EFT (Figure 1), and their microbiological composition was assessed using culture-based methods. Globally, the same bacterial profile could be observed in the three different feed types (Supplemental Table 2 – Supplemental Digital Content). *Staphylococcus* was the genus most frequently isolated from OMM samples (93%) in contrast with DM and formula ones where it was present in 37% and 11% of them, respectively. *Enterococcus* was the Gram-positive genus most frequently found in DM and formula samples (49% and 27%, respectively) but it could also be isolated from a high percentage (61%) of the OMM samples. Some Gram-negative bacteria, such as *E. coli*, *Klebsiella* spp. or *Serratia* spp., were also isolated from the three feed types, too (Supplemental Table 2 – Supplemental Digital Content). Mean bacterial counts of *Enterococcus* (P=0.004), *Staphylococcus* (P<0.001) and *Serratia* (P=0.05) were significantly higher in OMM samples (5.03, 4.82 and 5.58 log₁₀ CFU/ml, respectively) than in the other two feed types (Supplemental Table 2 – Supplemental Digital Content).

At the species level, *S. epidermidis* was the dominant species in OMM samples while *E. faecalis* was the most abundant in those of DM and infant formula (Supplemental Figure 1 – Supplemental Digital Content). *S. marcescens* accounted for more than 23% of the total bacteria isolated from infant formula samples. Three *Lactobacillus* species (*Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus salivarius*) and two *Bifidobacterium* species (*Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium breve*) were detected in this study. Among them, *L. salivarius*, *B. longum* and *B. breve* were only detected in OMM samples (Supplemental Figure 1 – Supplemental Digital Content).

The diversity and evenness of the microbial communities of the different feed samples after their pass through the external portion of the tubes were determined using the Shannon diversity index. The results obtained showed that the diversity present in OMM (1.15±0.09) samples was higher than that observed in those of DM and infant formula (0.59±0.11 and 0.41±0.06, respectively) (Supplemental Figure 1 – Supplemental Digital Content).

IV. 4. 3. Culture analysis of the meconium and fecal samples

The time required for spontaneous delivery of the first meconium varied between the first minutes to day 6 after birth. A total of 17 meconium and 128 weekly fecal samples were collected during the hospital stay of the infants that participated in the study; on average, 6.4 samples per infant were analyzed. Globally, inoculation of suitable dilutions of all the samples led to bacterial growth on the culture media tested, with the exception of five meconium samples. The dominant classes in all the samples analyzed were *Bacilli* and *Gammaproteobacteria*.

Meconium samples were characterized by an almost complete absence of Gram-negative bacteria, such as *E. coli*, *Klebsiella* spp. or *Serratia* spp. ($P<0.001$), a higher frequency of *Streptococcus* spp. ($P=0.02$) and a lower one of *Staphylococcus* spp. ($P<0.001$) when compared with the fecal samples (Supplemental Table 3– Supplemental Digital Content).

Mean bacterial counts obtained when meconium samples were cultured in general media, such as BHI and WC, varied between 3.65 and 9.85 \log_{10} CFU/g whereas in feces samples ranged from 5 to 10.17 \log_{10} CFU/g. Mean counts of all bacterial groups were higher in feces than in meconium samples but, at the genus level, the differences were statistically significant only for *Streptococcus* ($P=0.03$) and other Gram-positive bacteria ($P=0.03$) (Supplemental Table 3 – Supplemental Digital Content).

In relation to the succession of the different microbial groups in the fecal samples throughout the infants' hospital stay, the detection frequency of the genus *Enterococcus* remained high in all the samples while that of *Staphylococcus* or *Lactobacillus* decreased after the first and second month of life, respectively (Supplemental Table 4– Supplemental Digital Content). Although the number of tested samples decreased as the number of months increased, the detection frequency of *Klebsiella* was significantly lower ($P=0.003$) after the third month of life (Supplemental Table 4– Supplemental Digital Content).

The number of species detected in the meconium and fecal samples ranged from 5 to 20, including up to 5 classes and 12 genera (Supplemental Figure 2– Supplemental Digital Content). Despite the inter-individual variability observed in the composition of the cultivable fecal microbiota of the infants, *E. faecalis* and *S. epidermidis* were isolated most frequently, being present in 100% and 96% of the samples, respectively (Supplemental Figure 2– Supplemental Digital Content). Other abundant species belonging to the Class *Bacilli* were *E. faecium* (77%), *L. fermentum* (42%) and *S. aureus* (38%). Additionally, *L. gasseri* and *L. salivarius* were isolated from 8% of the samples. With respect to the Class *Gammaproteobacteria*, the predominant species were *K. pneumoniae* (88%), *E. coli* (81%), *S. marcescens* (81%), *Enterobacter cancerogenus* (46%), *Klebsiella oxytoca* (35%) and *Escherichia fergusonii* (31%) (Supplemental Figure 2– Supplemental Digital Content).

Finally, six different genera of the phylum *Actinobacteria* (*Rothia*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Dermabacter*, *Corynebacterium* and *Bifidobacterium*) were detected. Two species of bifidobacteria, *B. breve* and *B. longum*, could be isolated from a total of 4 infants (Supplemental Figure 2– Supplemental Digital Content).

The diversity of the microbial communities, assessed using the Shannon-Weaver index, was lower in meconium samples (0.42) than in the fecal ones (1.19-1.35) while the highest microbial diversity was reached after the third month of life (1.35) (Supplemental Figure 3– Supplemental Digital Content).

Potential associations between demographic and clinical parameters and isolation of the different genera were assessed using the Fisher's test (Supplemental Figure 4– Supplemental Digital Content). The isolation of the genus *Serratia* seemed to be strongly influenced by demographic or clinical variables related to prematurity while the presence of *E. coli* was higher in fecal samples from infants with a lower degree of prematurity (Supplemental Figure 4– Supplemental Digital Content).

IV. 4. 4. Genotyping of milk and fecal isolates

The isolates belonging to the most frequently detected species in all the samples and sampling points (*E. faecalis*, *E. faecium*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*) were genotyped by RAPD and PFGE.

Sharing of bacterial strains between milk samples collected after their pass through the feeding system and infant feces was observed at different time points in 23 of the 26 cases (Table 2). The number of bacterial genotypes shared in each case oscillated between 1 and 6. The highest strain diversity was detected in the *S. epidermidis* and *E. faecalis* species where 17 and 9 different genotypes were distinguished respectively. Among the *S. aureus* isolates 4 different genotypes were found and only 1 among the *E. faecium* isolates (Table 6).

Some genotypes such as *E. faecalis* genotype E-c or *K. pneumoniae* genotype K-g were found in different cases suggesting that these strains may have an environmental origin (Table 6).

IV. 4. 5. SEM analysis of the NEFTs

The selected parts of six EFT with their respective connectors and NEFT were analyzed by SEM. The time that the tubes were placed into a preterm infant was the factor that exerted the highest influence on bacterial growth. Thick bacterial biofilms were observed inside the EFT (Figure 2 A-C) and connectors (Figure 2 D-F) that were used for 24 h and they seemed to be particularly complex in NEFT that were used for more than 48 h (Figure 2 G-J). In contrast, only milk residues (but no bacteria) could be

observed in the inner surfaces of those NEFT that were placed for less than 12 h (Figure 2K and 2L).

IV. 5. DISCUSSION

In the present study, the succession of the bacterial species in meconium and feces of preterm infants during their stay in the NICU was assessed by culture-based methods. In addition, bacterial diversity was also studied in preterm feed (OMM, DM, preterm formula) after their pass through the external part of the feeding tubes.

Few studies have considered the role of neonatal NEFTs as a site of bacterial colonization and, as a consequence, as a source of bacteria for preterms and the influence of the feeding regime on the pattern of colonization of such devices. However, such studies have revealed the consistent presence of staphylococci (*S. epidermidis*, *S. aureus*), enterococci (*E. faecalis*, *E. faecium*) and *Enterobacteriaceae* (*K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *E. cancerogenus*, *E. cloacae*, *E. coli*), including clones harboring antibiotic resistance genes, from the inner wall of most enteral feeding tubes analyzed so far [17-19]. All these studies investigated NEFTs (the part of the enteral feeding system that is introduced into the neonate's digestive tract) while our work was focused, for the first time, on the EFTs, which are not in direct physical contact with the preterm (Figure 1). However, the same or closely related microorganisms could be also detected in our study from OMM, DM and formula samples after their pass through the EFTs.

SEM analysis of the internal surfaces of some sets of EFTs, connectors and NEFTs revealed that complex microbial biofilms were formed when such devices were placed for, at least, more than 12 h. As previously described, NEFTs are kept at 37°C and can be in place for more than 48 h, acting as a significant amplifying step for opportunistic pathogens arising from the host gastrointestinal tract [17]. As biofilms age, bacteria will break off in clumps which, subsequently, will inoculate any fresh feed in the tube lumen leading to further bacterial multiplication and to the reinoculation of the preterm gut with hospital-related microbiota. On the other hand, NEFTs will contaminate EFTs at the connector level, becoming an additional source and reservoir of the own host's gastrointestinal bacteria. Therefore, it is not strange that the fecal microbiota of preterm infants is usually dominated by cultivable bacteria that are prevalent in antibiotic-rich NICUs environments [3,4,10].

In this study, the samples that, globally, showed the highest concentrations of bacteria after their pass through the tubes were those of OMM. This is an expected finding since, in the last decade, human milk has been shown to be a natural source of bacteria to the infant gut [20]. OMM is given either immediately after collection or after cold storage, which preserves bacterial diversity of this biological fluid [21]. In contrast, single-use infant formula is sterilized while DM is pasteurized, a treatment that kills all vegetative bacterial cells and that only *Bacillus* spp. spores may stand [22]. Therefore, temperature and hygiene control must be exquisite when dealing with post-pasteurized donor's milk in order to avoid contaminations or spores' outgrowth.

The major difference between OMM and the other two feed types was the isolation frequency and concentration of staphylococci (mainly *S. epidermidis*), which

were significantly higher among the first type of samples. Staphylococci constitute, at least quantitatively, the first bacterial group found in the microbiome of human milk [23-25]. Previously, culture-based methods revealed that *S. epidermidis* is the most prevalent species both in human milk and in feces of breastfed infants while it is practically absent in those of formula fed-infants [26]. In fact, this species can be considered as a differential trait of the fecal microbiota of breastfed infants in contrast to enterococci which, as observed in our work, are widespread in infant feces, independently of the feeding option [26]. Studies carried 20 years ago already described that staphylococci were common in feces of breastfed infants [27-30]. More recently, it has been shown that coagulase-negative staphylococci colonized 100% of breastfed Western infants from day 3 onwards [31]. Such staphylococci colonized vaginally- and cesarean section-delivered infants equally early. Interestingly, staphylococci seem to be the bacteria with the highest ability to use human milk oligosaccharides [32].

In relation to the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, they could be isolated from a low percentage of samples and, in the case of bifidobacteria, only after the pass of OMM samples through the EFTs. Such bacteria can also be isolated or detected, albeit at a lower rate, in non-heated human milk [33] however, their prevalence may be underrated using either culture-dependent or culture-independent techniques since their isolation is often more difficult than that of other bacteria while DNA isolation methods and currently used primers often lead to the preferential amplification of DNA sequences belonging to other bacterial groups [34,35]. Anyway, it has been observed that the concentration and complexity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations are significantly higher in breastfed than in formula-fed infants [36]. A recent study has revealed that detection of lactobacilli or bifidobacterial DNA in the milk samples was significantly lower in those women that had received antibiotherapy during pregnancy, delivery or lactation [33]. It has been long known that antibiotics are responsible for dysbiosis processes in the human microbiota, leading to antibiotic-associated diarrhea and gastroenteritis, urogenital and oral infections. In this context, it must be taken in account that a very high proportion of women having a preterm delivery receive antibiotherapy.

E. coli, *Klebsiella* spp. and other enterobacteria, which comprises non-pathogenic as well as potentially pathogenic bacteria, can be occasionally detected in breast milk of healthy women [37,38] and molecular studies have shown that they are among the first colonizers of the infant gut, where they can coexist with Gram-positive bacteria [39]. *Cronobacter sakazakii*, which is a major concern in NICUs, was also isolated from the internal surface of NEFTs in previous studies [17-19]. However, this species could not be detected in our work.

Despite differences in bacterial diversity and concentrations, a common bacterial pattern was observed in the three types of feed after their pass by the EFTs. As stated before, this may reflect the enteric contamination from the NEFTs at the connector level and, also, the remains of bacteria present in non-heated milk since different types of feed may be administered to the same neonate through the same EFT (Supplemental

Table 1- Supplemental Digital Content). Therefore, the practice of prolonged placement of either NEFTs, EFTs or connectors in neonates needs to be reconsidered.

Human milk is not sterile but it does contain a plethora of other biologically active compounds, including antibacterial agents, such as maternal antibodies, lactoferrin, and lysozyme. This fact may explain why, although it may account for higher concentrations of bacteria in the EFT, it is also associated with lower numbers of *Enterobacteriaceae* in the inner portions of NEFTs in comparison with other feeding regimes [17]. This effect can contribute to the health beneficial effects that are associated to the use of breast milk for preterm at NICUs settings.

Preterm neonates are usually characterized by an abnormal pattern of gut colonization in comparison to that of healthy term ones [34,40-42]. This fact is important for infant's health since such a pattern is considered as a risk factor for the development of gastrointestinal infections and necrotizing enterocolitis [43]. Analysis of the meconium and fecal samples led to results very similar to those obtained with a similar (although smaller) cohort of preterm infants born in the same hospital [44]. Globally, the analysis of the meconium and fecal samples revealed a low species diversity and high inter-individual variability, as previously described [3,9,40]. Bacterial diversity in meconium samples was lower than in feces. Bacilli and other *Firmicutes* dominated in meconium while Proteobacteria did it in the fecal samples. At the genus level, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* and *Lactobacillus* predominated in meconium samples while members of the family *Enterobacteriaceae*, such as *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp. or *Serratia* spp., rapidly became dominant in feces, a fact that has been repeatedly reported [4,44,45]. Presence of *Serratia* spp. was strongly associated with several hospital-related parameters, which confirms the results obtained by Moles et al. (2013) [44].

Fear of sepsis and other infections often leads to an early and widespread use of broad-spectrum antibiotics at the NICUs that, in turn, increases the risk of colonization with those bacteria highly prevalent in hospital settings, including resistant bacterial strains. The high influence of the environment explains the tendency to uniformity in the bacterial communities of preterm infants during their stay at the NICU [10]. In fact, bacterial profiles found in the internal surface of the EFTs, the feeds after their pass through them and the fecal samples were very similar, creating a vicious circle responsible for the reduced bacterial diversity observed in preterm fecal samples. Future works should address novel strategies to minimize the impact of the NICU's environment on the early colonization of the preterm gut.

IV. 6. REFERENCES

1. Blaut M, Clavel T. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *J Nutr.* 2007;137:751S-5S.
2. Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, et al. The infant microbiome development: mom matters. *Trends Mol Med.* 2015;21:109-117.
3. Mshvildadze M, Neu J, Shuster J, et al. Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques. *J Pediatr.* 2010;156:20-25.
4. LaTuga MS, Ellis JC, Cotton CM, et al. Beyond bacteria: a study of the enteric microbial consortium in extremely low birth weight infants. *PLoS One.* 2011;6:e27858.
5. De la Cochetière MF, Piloquet H, des Robert C, et al. Early Intestinal Bacterial Colonization and Necrotizing Enterocolitis in Premature Infants: The Putative Role of Clostridium. *Pediatr Res.* 2004;56:366-370.
6. Madan JC, Salari RC, Saxena D, et al. Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition.* 2012;97:F456-F462.
7. Neu J. The Microbiome and Its Impact on Disease in the Preterm Patient. *Curr Pediatr Rep.* 2013;1:215-221.
8. Rouge C, Goldenberg O, Ferraris L, et al. Investigation of the intestinal microbiota in preterm infants using different methods. *Anaerobe.* 2010;16:362-370.
9. Jacquot A, Neveu D, Aujoulat F, et al. Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *J Pediatr.* 2011;158:390-396.
10. Schwartz A, Gruhl B, Lobnitz M, et al. Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr Res.* 2003;54:393-399.
11. American Academy of Pediatrics. Section on Breastfeeding; Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics.* 2012;129:e827-41.
12. Agostoni C, Braegger C, Decsi T, et al. Breast-feeding: A commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;49:112-125.
13. Arslanoglu S, Corpeleijn W, Moro G, et al. Donor human milk for preterm infants: current evidence and research directions. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013;57:535-542.

14. Nye C. Transitioning premature infants from gavage to breast. Neonatal Netw. 2008;27:7-13.
15. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. Science. 1999;284:1318-1322.
16. Bussy V, Marechal F, Nasca S. Microbial contamination of enteral feeding tubes occurring during nutritional treatment. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 1992;16:552-557.
17. Hurrell E, Kucerova E, Loughlin M, et al. Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonisation by members of the *Enterobacteriaceae*. BMC Infect Dis. 2009;9:146-2334-9-146.
18. Mehall JR, Kite CA, Gilliam CH, et al. Enteral feeding tubes are a reservoir for nosocomial antibiotic-resistant pathogens. J Pediatr Surg. 2002;37:1011-1012.
19. Mehall JR, Kite CA, Saltzman DA, et al. Prospective study of the incidence and complications of bacterial contamination of enteral feeding in neonates. J Pediatr Surg. 2002;37:1177-1182.
20. Fernandez L, Langa S, Martin V, et al. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. Pharmacol Res. 2013;69:1-10.
21. Marin ML, Arroyo R, Jimenez E, et al. Cold storage of human milk: effect on its bacterial composition. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2009;49:343-348.
22. Gómez de Segura A, Escuder D, Montilla A, et al. Heating-induced bacteriological and biochemical modifications in human donor milk after holder pasteurisation. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2012;54:197-203.
23. Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, et al. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. PLoS One. 2011;6:e21313.
24. Jost T, Lacroix C, Braegger C, et al. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. Br J Nutr. 2013;110:1253-1262.
25. Ward TL, Hosid S, Ioshikhes I, et al. Human milk metagenome: a functional capacity analysis. BMC microbiology. 2013;13:116.
26. Jimenez E, Delgado S, Maldonado A, et al. *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. BMC Microbiol. 2008;8:143-2180-8-143.

27. Lundequist B, Nord CE, Winberg J. The composition of the faecal microflora in breastfed and bottle fed infants from birth to eight weeks. *Acta Paediatr Scand*. 1985;74:45-51.
28. Sakata H, Yoshioka H, Fujita K. Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *Eur J Pediatr*. 1985;144:186-190.
29. Balmer SE, Wharton BA. Diet and faecal flora in the newborn: breast milk and infant formula. *Arch Dis Child*. 1989;64:1672-1677.
30. Wharton BA. *Nutrition and feeding of preterm infants*; Blackwell, Oxford. 1987.
31. Adlerberth I, Lindberg E, Aberg N, et al. Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle? *Pediatr Res*. 2006;59:96-101.
32. Hunt KM, Preuss J, Nissan C, et al. Human milk oligosaccharides promote the growth of staphylococci. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78:4763-4770.
33. Soto A, Martin V, Jimenez E, et al. Lactobacilli and Bifidobacteria in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014.
34. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, et al. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007;5:e177.
35. Turroni F, Peano C, Pass DA, et al. Diversity of Bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PLoS One*. 2012;7:e36957.
36. Roger LC, Costabile A, Holland DT, et al. Examination of faecal *Bifidobacterium* populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life. *Microbiology*. 2010;156:3329-3341.
37. Perez PF, Dore J, Leclerc M, et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics*. 2007;119:e724-32.
38. Martin R, Heilig H, Zoetendal EG, et al. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Res Microbiol*. 2007;158:31-37.
39. Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, et al. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68:219-226.
40. Magne F, Abely M, Boyer F, et al. Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by sequences of 16S rRNA

- genes and PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles. *FEMS Microbiol Ecol.* 2006;57:128-138.
41. Butel MJ, Suau A, Campeotto F, et al. Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: a prospective analysis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007;44:577-582.
 42. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108 Suppl 1:4578-4585.
 43. Siggers RH, Siggers J, Thymann T, et al. Nutritional modulation of the gut microbiota and immune system in preterm neonates susceptible to necrotizing enterocolitis. *J Nutr Biochem.* 2011;22:511-521.
 44. Moles L, Gómez M, Heilig H, et al. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS ONE.* 2013;8:e66986.
 45. Blakey JL, Lubitz L, Barnes GL, et al. Development of gut colonisation in preterm neonates. *J Med Microbiol.* 1982;15:519-529.

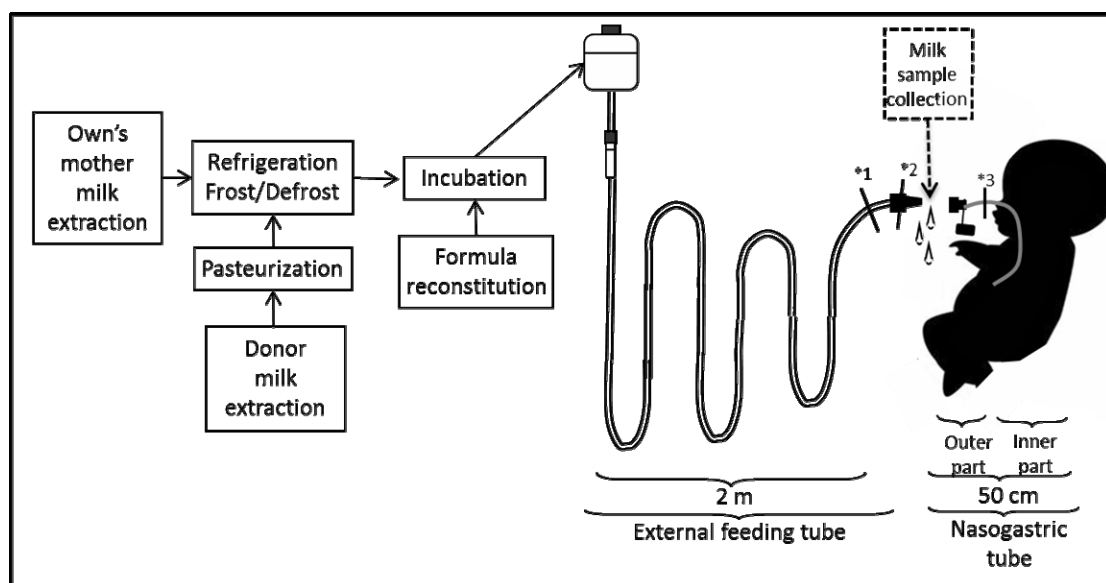


Figure 1. Diagram showing the required parts for enteral nutrition and its order from the milk extraction to the stomach of the infant. A syringe is connected to a feeding tube of approximately 2 m of length and a nasogastric tube of 50 cm. Milk sample is collected after the feeding tube and before the nasogastric tube. SEM images were taken in the points marked as *1, feeding tube, *2 connector and *3 nasogastric tube.

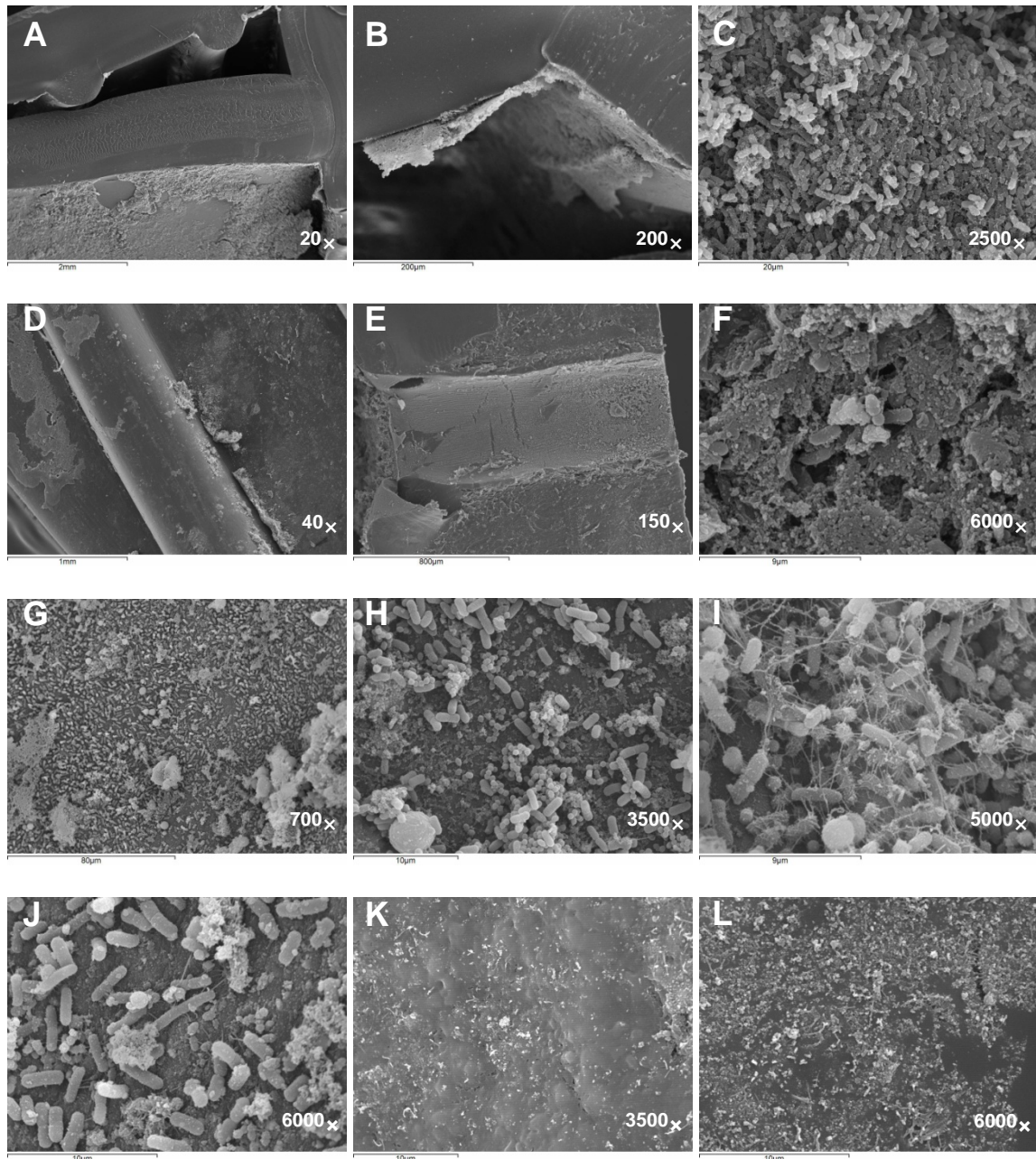


Figure 2. SEM pictures of the internal portion of different feeding systems. **A**, **B** and **C** show a thick biofilm inside the external feeding tube (EFT) at different magnification. The connector part of the same EFT is presented in images **D**, **E** and **F** where leftovers of milk joined together with bacterial communities can be seen. Images from **G** to **L** were taken from the internal part of nasogastric enteral feeding tubes (NEFT) at different conditions. Images **G**, **H**, **I** and **J** belong to a NEFT used more than 48 hours; diverse bacterial forms and strong junctions between them are shown at different magnifications. Images **K** and **L** were taken from a NEFT that was placed less than 12 hours and milk leftovers but no bacteria can be observed.

TABLE 1. Demographic data and clinical characteristics of preterm infants (n=26) participating in this study

Characteristics	Mean (95%CI) or no. (%)
Gestational age (wk)	27.7 (26.6;28.7)
Gender	
Male	13 (50%)
Female	13 (50%)
Birth weight (g)	1,167.3 (987.3;1347.3)
Z score	-0.23 (-0.50;0.04)
Delivery mode	
Vaginal section	12 (46%)
Cesarean section	14 (54%)
Antibiotherapy	
No	2 (8%)
Yes	24 (92 %)
<3 days	11 (42%)
>3 days	13 (50%)
Sepsis	7 (27%)
Parenteral nutrition, n=22 (days)	12 (5-13) ^a
Enteral feeding tube (days)	59 (46;72)
Mechanical ventilation, n=16 (days)	23 (1-36) ^a
CPAP^b, n=21 (days)	23 (12-34)
Oxygenotherapy, n=20 (days)	43.5 (1-83) ^a
NICU stay (days)	52 (18-81) ^a
Hospital stay (days)	69 (41-92) ^a
Type of feeding	
Human milk ^c	8 (30.77%)
Mixed feed from 6 th week of life ^d	10 (38.46%)
Mixed feed ^e	8 (30.77%)

^aMedian (IQR).^bCPAP, Continuous positive airway pressure; NICU, Neonatal intensive unit care.^cInfants received their own mother's milk and/or donor milk during all the hospital stay.^dInfants fed with their own mother's milk and/or donor milk exclusively during the first 6 weeks of life and formula milk was introduced after then.^eInfants received their own mother's milk and/or donor milk and/or formula milk from birth.

TABLE 2. PFGE genotypes isolated from feces and milk samples

Case	Infant feces genotypes								Milk samples genotypes							
	Meconium	7 days	14 days	21 days	28 days	35 days	42 days	49 days	0 days	7 days	14 days	21 days	28 days	35 days	42 days	49 days
1		E-a K-a Se-a	E-a K-a Se-a	E-b K-a						E-b K-a	E-a E-b Se-a					
2		E-c	E-c Sa-a	E-c Sa-a Sa-b			Se-b				E-c Sa-a Sa-b Se-b	E-c				
3		E-d K-b	E-d K-b	E-d Em-a	E-d Em-a Sa-c K-b K-c	Se-c						E-d Em-a Sa-c K-b K-c	E-d Se-c		K-c	
4	E-c	E-c	E-c Se-d	E-c						E-c Se-d						
5		E-c Se-e Se-f	E-c Se-e K-d	E-c K-d						Se-e		E-c Se-f K-d				
6	E-c Se-g		E-c	E-c E-b Se-g Se-h	Se-h	Se-h/i			E-c Se-g	Se-g Se-h	E-b Se-g Se-h	E-b	E-b	Se-h/i		Se-h/i
7	E-c	E-c	E-c	E-c E-e Se-i								E-c E-e Se-i				
8	Se-j	E-f Se-j	E-f Se-j	E-f	E-f					E-f Se-j	E-f Se-j	E-f	E-f			
9				E-b K-b	E-c Sa-d					K-b		E-b E-c Sa-d	Sa-d		E-c	
10			E-b E-d Se-i								E-b E-d Se-i					

11		K-e	Se-k K-e																
12			K-f																
13				Se-l															
14		K-g	E-g Se-m						K-g	K-g	Se-m							E-g	
15		K-g	K-g	K-g					K-g	K-g									
16			E-c Se-n						E-c		E-c Se-n								
17		K-h		E-h							E-h K-h								
18			E-c	E-c				Se-o			E-c		Se-o					Se-o	
19	K-g	Se-p K-g	K-g						Se-p		K-g								
21	Se-q	Se-q						Se-q			Se-q								
24				K-f							K-f								
25				E-c							E-c								
26					E-i						E-i								

E, *Enterococcus faecalis*

Em, *Enterococcus faecium*

Sa, *Staphylococcus aureus*

Se, Staphylococcus epidermidis

K, *Klebsiella pneumoniae*

a-q, each letter refers to a different PFGE profile

SUPPLEMENTAL MATERIAL AND METHODS

Culture analysis of the samples and bacterial identification

Adequate dilutions of human milk, infant formula, meconium and stool samples were spread onto different culture media as previously described [1]. Microbial counts were recorded as the colony forming units (CFU)/ml or g and transformed to \log_{10} values before statistical analysis. At least one representative of each colony morphology type was isolated from each plate and genotyped and identified as previously described [1].

Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) and Pulse Field Gel Electrophoresis.

Genetic relatedness among selected bacteria from milk and infants feces was investigated by RAPD to avoid duplication of isolates from the same host sample and to determine if a given genotype was shared. RAPD profiles were obtained using primer OPL5 (5'-ACGCAGGCAC-3') [2]. This primer was originally designed for lactobacilli but it has been shown to be useful also for typing other species [3].

Those isolates with the same RAPD profile were subjected to pulsed field gel electrophoresis (PFGE) in a CHEF DR II apparatus (Bio-Rad, Birmingham, UK) with different protocols. To separate *SmaI* fragments of enterococci and staphylococci species a pulse time was applied from 2 to 28 s for 24 h for the former and from 5 to 15 s for 10 h and then another from 15 to 60 s for 13 h, for the latter. The chromosomal DNA of *K. pneumoniae* isolates were digested with *XbaI* enzyme and the restriction fragments separated by electrophoresis with a pulse time from 1 to 40 s for 20 h. Computer-assisted analysis was performed with InfoQuest FP software (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Cluster analysis of RAPD and PFGE pattern profiles was performed using the UPGMA method based on the Dice correlation similarity coefficient.

Scanning electron microscopy (SEM) analysis

The 6 feeding devices were fixed in 4% (v/v) paraformaldehyde and 2.5% (v/v) glutaraldehyde in PBS pH 7.2 for 4 h at 4 °C and, then, washed with cold PBS every 20 min for, at least, 4 times. The tubes were cut into 1 cm long pieces and dissected to expose the internal surface longitudinally. The tube pieces were stained with 1% (v/v) osmium tetroxide (EM grade) solution for 90 min at room temperature. This was followed by washing with deionized water and a complete dehydration of the samples in a series of increasing ethanol concentrations (50% to 100%). Subsequently, the samples were dried without introducing surface tension artifacts by using a critical point drier.

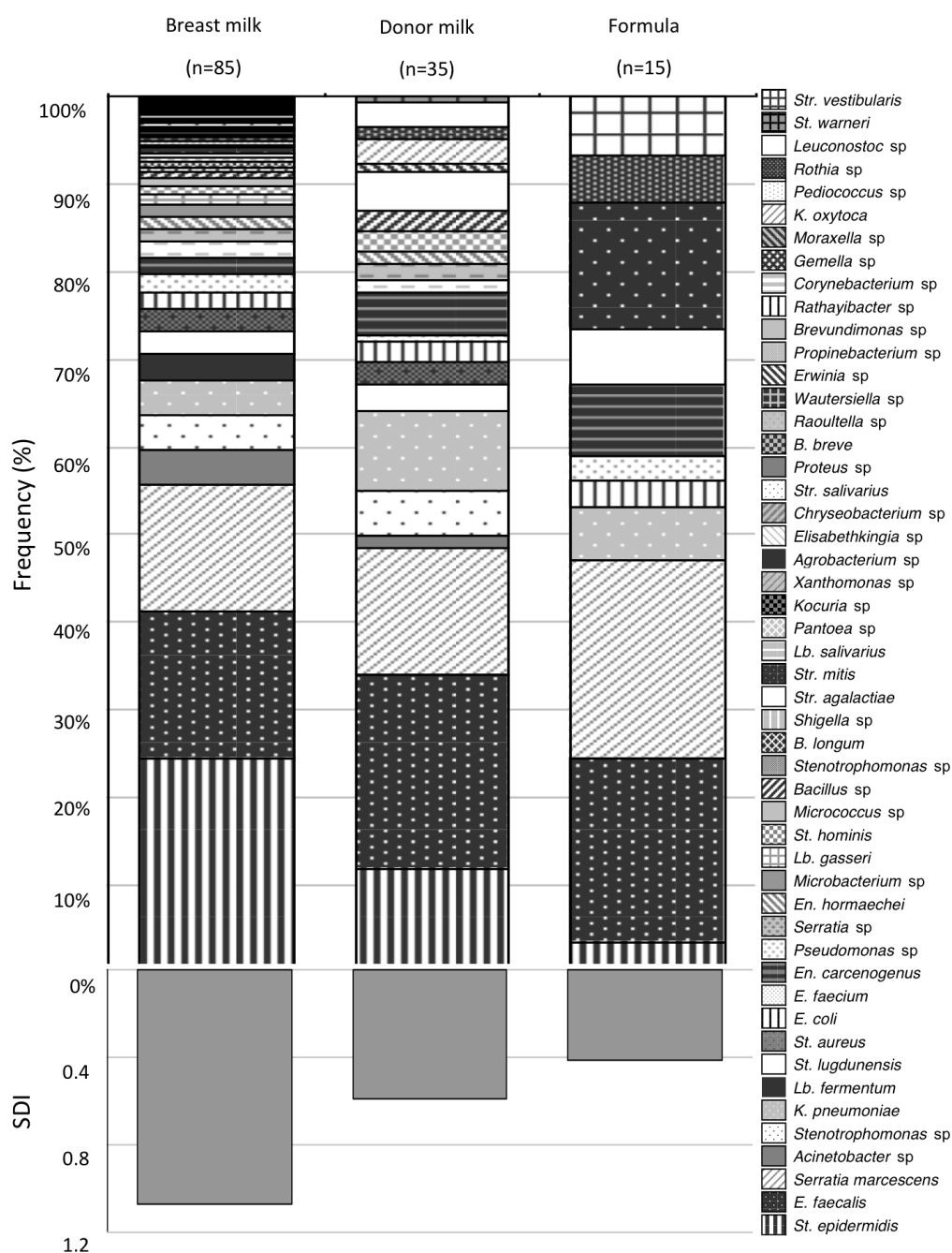
The air-dried biopsies were then mounted on aluminum stubs, sputter-coated with a very thin film of gold and examined using a scanning electron microscope (JEOL 6400 JSM) at the Centro Nacional de Microscopía Electrónica (Madrid).

Statistical Analysis

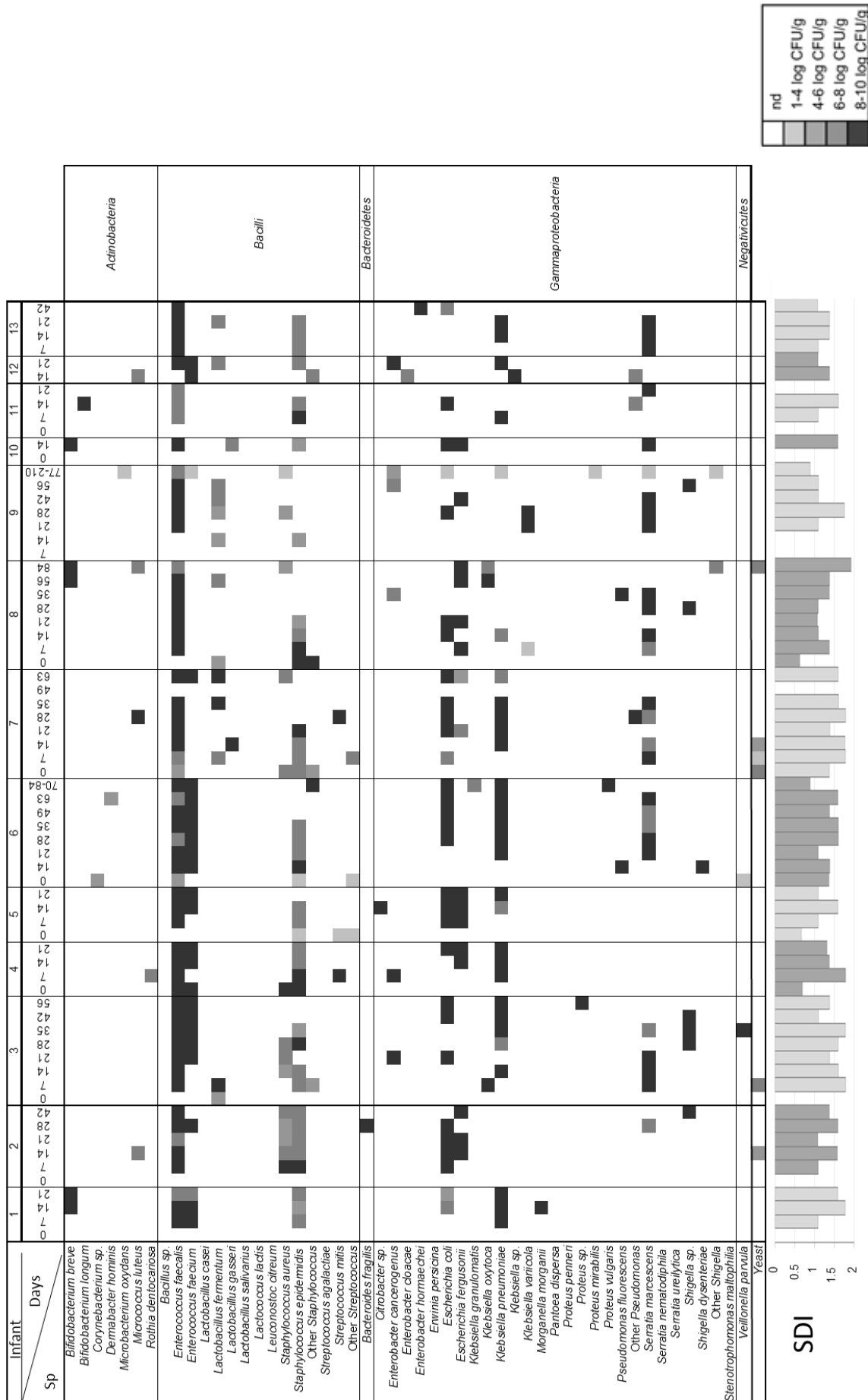
Quantitative data were expressed as the mean and 95% confidence interval (CI) of the mean or, when they were not normally distributed, as the median and interquartile range (IQR). The bacterial richness and diversity of the collected samples were determined by calculating the Shannon-Weaver diversity index, which takes into account the number and evenness of the bacterial species. Chi-square statistics, including the Fisher's exact test and the Freeman-Halton extension of the Fisher exact probability test for 2×4 contingency tables, were used to compare proportions. Friedman's non-parametric repeated measures comparisons and paired samples *t*-tests were applied to determine differences between the bacterial counts of each identified microbial group across time. Differences were considered significant at $P < 0.05$. Statgraphics Centurion XVI version 16.1.15 (Statpoint Technologies Inc., Virginia, USA) and R 2.13.2 (R project, Statistical Software) software were used to carry out the analyses cited above.

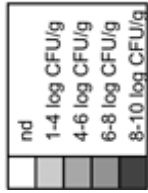
References

1. Moles L, Gómez M, Heilig H, et al. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. PLoS ONE. 2013;8:e66986.
2. Veyrat A, Miralles MC, Pérez-Martínez G. A fast method for monitoring the colonization rate of lactobacilli in a meat model system. J Appl Microbiol. 1999;87:49-61.
3. Jimenez E, Delgado S, Maldonado A, et al. *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. BMC Microbiol.

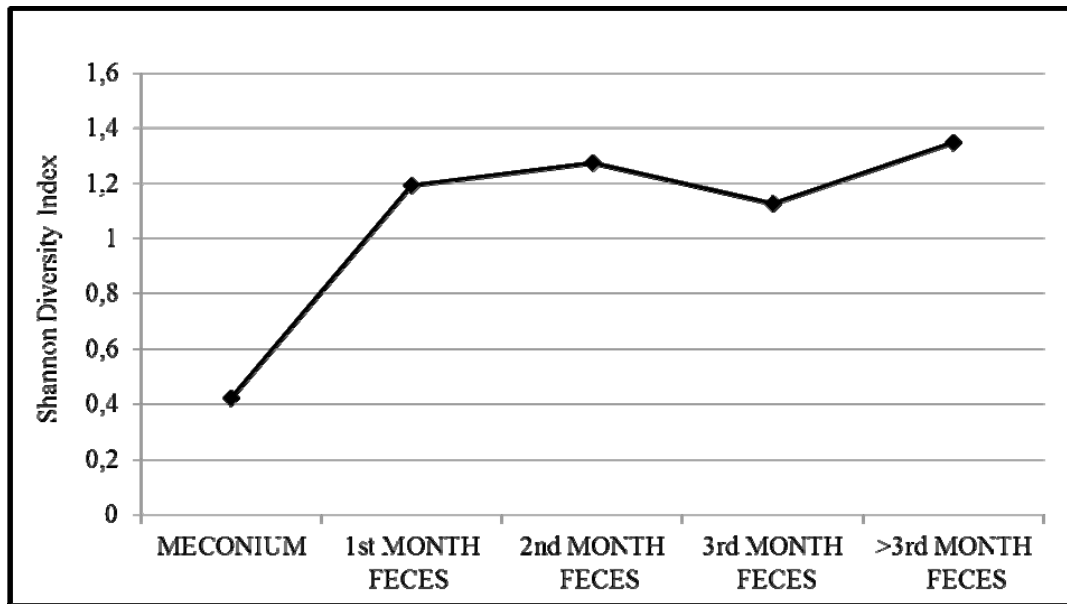


Supplemental Figure 1. Frequency of bacterial species isolated from own's mother milk (OMM), donor milk (DM) and infant formula. On the bottom, Shannon Diversity Index of each type of food.

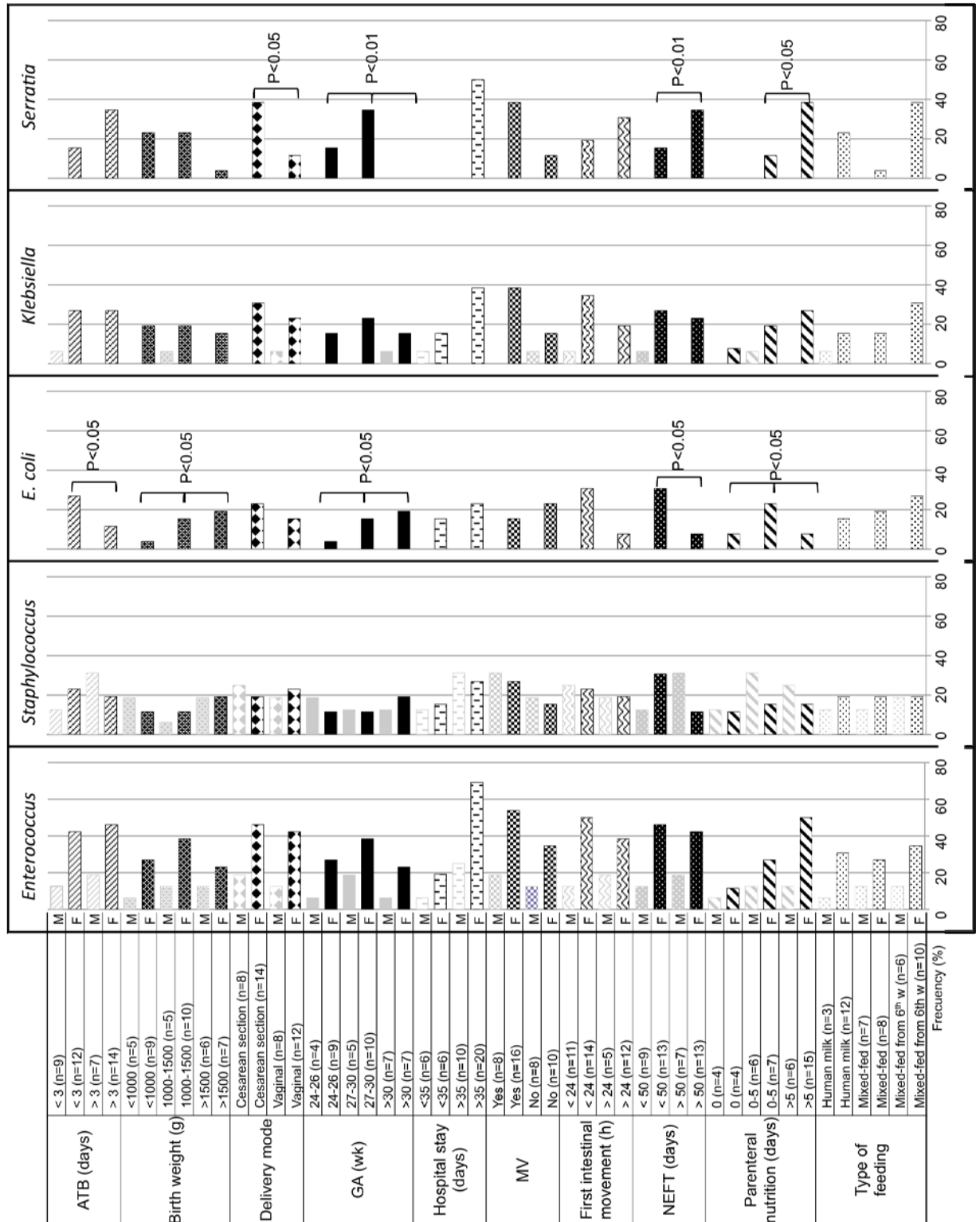




Supplemental Figure 2. Counts of microbial species isolated from infants' fecal samples and identified by species-specific PCR or 16S rRNA sequencing PCR. Meconium and different days of fecal collection samples are represented by arabics numerals. Concentrations of the identified species are represented in a grey scale from non detected (nd) in white to $8 - 10 \log_{10}$ CFU/ml in black. On the bottom, Shannon Diversity Index of the different collection times is represented.



Supplemental Figure 3. Shannon Diversity Index of meconium and fecal samples along the hospital stay of the infants that participated in the study.



Supplemental Figure 4.

Associations between demographic and clinical data and the presence of the isolated genera or microbial group from preterm infants' meconium (M) or fecal samples during at least two weeks in the study (F) assessed using Fisher's tests.

ATB, Antibiotherapy; GA, gestational age; MV, mechanical ventilation; NEFT, nasogastric enteral feeding tube.

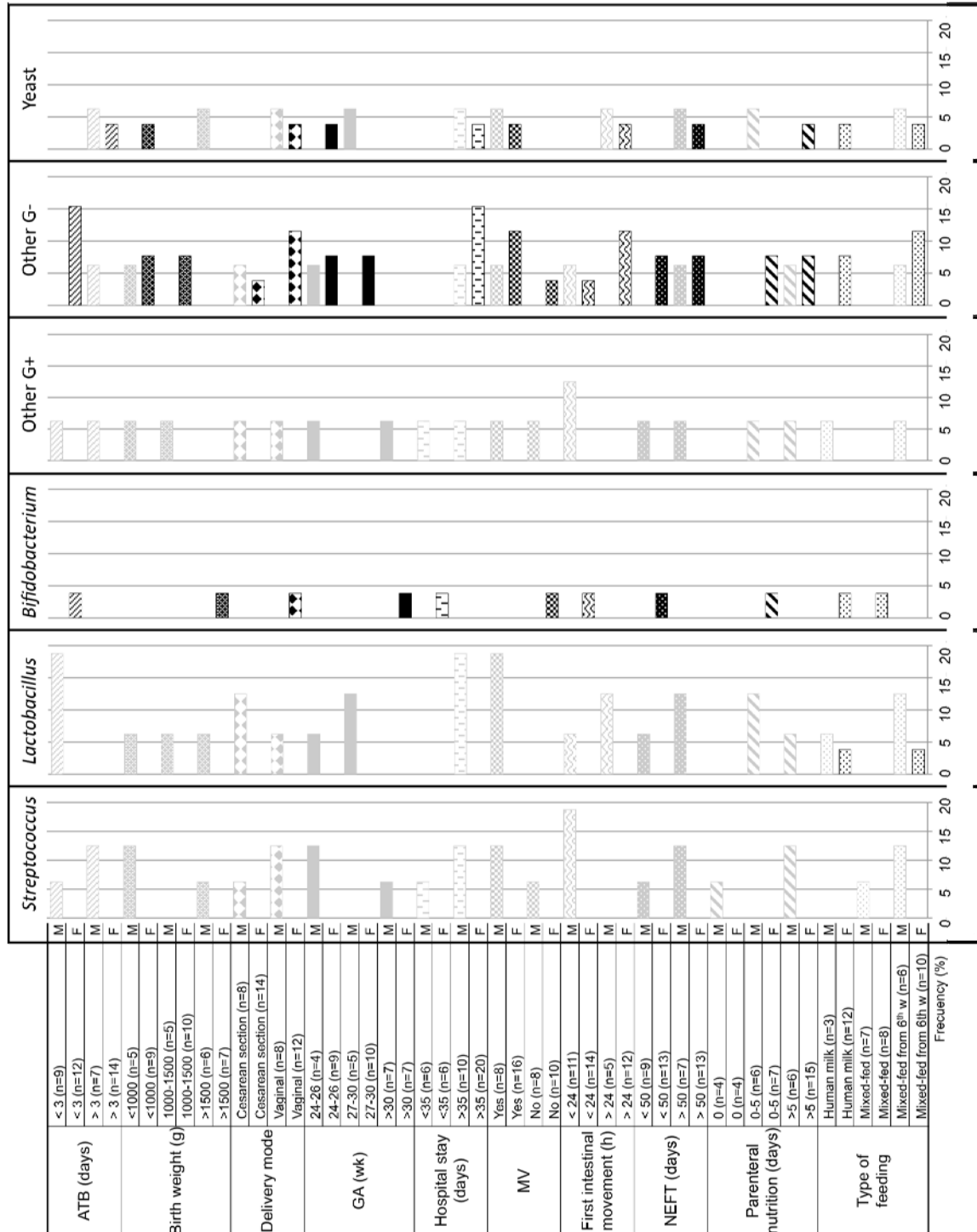


Table S1. Feeding pattern of the preterm neonates studied in this work during their first 2 months of life

Infant	1 st week			2 nd week			3 rd week			4 th week			5 th week			6 th week			7 th week			8 th week		
	OMM	DM	PF	FM	OMM	DM	PF	FM	OMM	DM	PF	FM	OMM	DM	PF	FM	OMM	DM	PF	FM	OMM	DM	PF	FM
1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
3	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
4	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
5	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
6	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
7	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
8	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
9	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
10	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
11	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
12	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
13	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
14	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
15	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
16	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
17	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
18	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
19	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
20	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
21	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
22	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
23	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
24	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
25	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
26	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+

OMM, own mother's milk; DM, Donor milk, PF, preterm formula; FM, formula milk; F, fortification; B, breast feed.

Table S2. Microbiological characterization of isolates from Own Mother Milk (OMM), Donor (DM) and Formula Milks (FM) after their pass through enteral feeding tubes, used to feed the preterm neonates of this study.

Microorganism	OMM (N = 85)			DM (N = 35)			FM (N = 15)			P ^c
	n (%)	Microbial Counts ^a	n (%)	n (%)	Microbial Counts ^a	n (%)	n (%)	Microbial Counts ^a	P ^b	
<i>Bifidobacterium</i>	2 (2)	5.68 (2.65-8.70) ^d	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	-	-	-	-
<i>Enterococcus</i>	53 (61)	5.03 (4.63; 5.43)	17 (49)	3.68 (3.00; 4.37)	4 (27)	3.88 (0.96; 6.81)	0.040	0.004		
<i>Lactobacillus</i>	14 (16)	4.07 (3.54-5.30) ^d	2 (6)	6.13 (5.08-7.18) ^d	2 (13)	2.67 (1.70-3.64) ^d	0.760	0.360*		
<i>Staphylococcus</i>	78 (93)	4.82 (4.30-5.30) ^d	13 (37)	2.94 (2.17; 3.71)	2 (11)	2.30 (2.00-2.60) ^d	<0.001	<0.001		
<i>Streptococcus</i>	5 (6)	4.21 (3.37; 5.04)	2 (6)	5.46 (3.78-7.14) ^d	3 (20)	5.35 (3.42; 7.27)	0.150	0.300		
Other G ⁺ ^e	16 (19)	3.42 (2.75; 4.09)	5 (14)	2.38 (1.60; 3.15)	1 (7)	3.93	0.470	0.200*		
<i>Escherichia</i>	10 (12)	3.46 (2.90; 4.02)	1 (3)	2.00	1 (7)	2.30	0.350	0.150		
<i>Klebsiella</i>	20 (24)	4.27 (3.63; 4.90)	8 (23)	4.20 (2.89; 5.50)	2 (13)	5.30 (4.56-6.04) ^d	0.680	0.590		
<i>Serratia</i>	45 (52)	5.58 (5.14; 6.02)	10 (29)	4.59 (3.67; 5.52)	4 (27)	4.23 (1.56; 6.89)	0.030	0.050		
Other G ⁻ ^f	32 (26)	4.86 (4.36; 5.37)	5 (14)	4.90 (2.09; 7.71)	1 (7)	3.30	0.005	0.600		
Yeast	5 (6)	3.59 (2.72; 4.47)	1 (3)	4.23	0 (0)	-	0.840	0.460		

N, number of total samples

n, number of positive samples

^aMicrobial counts (LOG CFU/mL) expressed as mean (95% CI).

^bFisher test was used to analyzed the frequency data

^cANOVA or KW(*) were used to analyzed the microbial counts data

^dMedian (IQR)

^eOther Gram-positive bacteria included the following genera: *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Corynebacterium*, *Elisabethkingia*, *Gemella*, *Kocuria*, *Leuconostoc*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Rathayibacter*, *Rothia* and *Wautersiella*.

^fOther Gram-negative bacteria included the following genera: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Brevundimonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Moraxella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Raoultella*, *Shigella*, *Stenotrophomonas* and *Xanthomonas*.

Table S3. Microbial groups isolated from meconium and feces of preterm neonates in this study.

Meconium (N = 12)			Feces (N = 128)			
		Microbial			Microbial	
Microorganism	n (%)	Counts ^a	n (%)	Counts ^a	P ^b	P ^c
<i>Bifidobacterium</i>	0 (0)	-	6 (5)	9.45 (8.92; 9.98)	0.580	-
<i>Lactobacillus</i>	3 (19)	5.27 (2.83;7.71)	17 (13)	7.34 (6.49; 8.19)	0.230	0.060
<i>Enterococcus</i>	7 (44)	6.48 (3.95;9.01)	66 (52)	7.21 (6.95;7.47)	0.650 [¥]	0.090 [#]
<i>Staphylococcus</i>	5 (20)	6.15 (3.64;8.66)	116 (72)	8.70 (8.13;9.15) ^d	<0.001 [¥]	0.990 [#]
<i>Streptococcus</i>	3 (19)	4.77 (0.07;9.47)	5 (4)	8.16 (6.21;10.11)	0.020	0.030
Other G ⁺ ^e	2 (13)	5.20 (4.70;5.70) ^d	11 (9)	7.11 (6.26;7.77)	0.310	0.030
<i>Escherichia</i>	0 (0)	-	67 (52)	8.98 (8.40; 9.41) ^d	<0.001	-
<i>Klebsiella</i>	1 (6)	7.27	81 (63)	8.84 (8.15;9.30) ^d	<0.001	0.190*
<i>Serratia</i>	0 (0)	-	65 (51)	9.04 (8.46; 9.48) ^d	<0.001	-
Other G ⁻ ^f	1 (6)	6.38	35 (27)	9.22 (8.18;9.61) ^d	0.130	0.130 [#]
Yeast	1 (6)	6.08	7 (6)	6.53 (5.27;7.80)	0.520	0.770

N, number of total samples

n, number of positive samples

^aMicrobial counts (LOG CFU/g) expressed as mean (95% CI)

^bFisher test or χ^2 (¥) were used to analyzed the frequency data

^cANOVA or KW([#]) were used to analyzed the microbial counts data

^dMedian (IQR)

Table S4. Mean counts and frequency of microbial groups isolated from feces of preterm neonates through the hospital stay.

Microorganism	1 st month feces (n= 76)			2 nd month feces (n= 27)			3 rd month feces (n= 17)			> 3 rd month feces (n= 8)		
	Number of positive samples (%)	Microbial Counts ^a Mean (95% CI)	Number of positive samples (%)	Microbial Counts ^a Mean (95% CI)	Number of positive samples (%)	Microbial Counts ^a Mean (95% CI)	Number of positive samples (%)	Microbial Counts ^a Mean (95% CI)	Number of positive samples (%)	Microbial Counts ^a Mean (95% CI)	P ^b	P ^c
<i>Bifidobacterium</i>	3 (4)	9.25 (8.53- 9.70) ^d	1 (4)	10.00	2 (12)	9.47 (9.31-9.63) ^d	0 (0)	-	0 (0)	-	0.55	-
<i>Enterococcus</i>	67(88)	8.52 (8.20-9.15) ^d	25 (93)	8.28 (7.82; 8.74)	17 (100)	8.75 (8.40; 9.10)	7 (88)	6.82 (6.29-7.16) ^d	7 (88)	6.82 (6.29-7.16) ^d	0.27 [§]	-
<i>Lactobacillus</i>	11 (14)	6.93 (5.66; 8.19)	4 (15)	8.37 (6.98; 9.75)	1 (6)	7.55	0 (0)	-	0 (0)	-	0.38	-
<i>Staphylococcus</i>	47 (62)	7.23 (6.91; 7.56)	9 (33)	7.10 (6.47; 7.73)	7 (41)	7.35 (6.19; 8.51)	3 (38)	6.82 (6.29-7.16) ^d	3 (38)	6.82 (6.29-7.16) ^d	0.83 [§]	<0.001
<i>Streptococcus</i>	4 (5)	7.88 (6.44-9.33) ^d	0 (0)	-	1 (6)	9.26	0 (0)	-	0 (0)	-	0.52	-
Other G ⁺ ^e	6 (8)	7.73 (7.15; 8.31)	3 (11)	7.47 (5.70-8.74) ^d	2 (12)	5.70	1 (13)	6.7	1 (13)	6.7	0.12	0.70
<i>E. coli</i>	36 (47)	8.95 (8.70-9.48) ^d	15 (56)	8.72 (8.36; 9.08)	12 (71)	8.57 (7.87; 9.26)	4 (50)	8.56 (7.68; 9.44)	4 (50)	8.56 (7.68; 9.44)	0.30 [§]	0.003
<i>Klebsiella</i>	45 (59)	8.88 (8.74-9.40) ^d	18 (67)	8.57 (8.11; 9.04)	13 (76)	7.93 (7.27; 8.59)	4 (50)	7.55 (6.23; 8.87)	4 (50)	7.55 (6.23; 8.87)	0.003 [§]	0.001
<i>Serratia</i>	34 (45)	9.07 (8.70-9.59) ^d	18 (67)	8.51 (8.07; 8.96)	8 (47)	8.63 (8.07; 9.20)	5 (63)	8.80 (7.74; 9.86)	5 (63)	8.80 (7.74; 9.86)	0.07 [§]	0.002
Other G ^{-f}	19 (25)	8.92 (8.33-9.69) ^d	10 (37)	8.25 (7.67; 8.83)	5 (29)	8.88 (7.80; 9.96)	2 (25)	9.58 (9.24-9.92) ^d	2 (25)	9.58 (9.24-9.92) ^d	0.06 [§]	0.20
Yeast	5 (7)	6.33 (4.40;8.25)	0 (0)	-	1 (6)	6.40	1 (13)	7.70	1 (13)	7.70	0.74	-

n, indicates total number of samples analyzed.

^aBacterial and yeast counts (LOG CFU/g).^bFisher test or χ^2 (°) were used to analyzed the frequency data^cANOVA was used to analyzed the microbial counts data^dMedian (IQR)^eOther Gram-positive bacteria included the following genera: *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Dermabacter*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Rathayibacter* and *Wautersiella*.^fOther Gram-negative bacteria included the following genera: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Morganella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Shigella*, *Stenotrophomonas* and *Veionella*.

V. Colonización intestinal en la UCI neonatal de recién nacidos prematuros y recuperación dos años después



V. Preterm infant gut colonization in the neonatal ICU and complete restoration two years later

*Manuscrito Aceptado para su Publicación en
"Clinical Microbiology and Infection"*

V. 1. ABSTRACT

Preterm infants in a Neonatal Intensive Care Unit (NICU) are exposed to multi-drug resistant bacteria previously adapted to the hospital environment. The aim of the present study was to characterize the bacterial antibiotic-resistant high-risk lineages colonizing preterm infants during their NICU stay and their persistence in faeces after 2 years.

A total of twenty-six preterm neonates were recruited between October 2009 and June 2010 and provided 144 faecal samples. Milk samples (86 mothers' milk, 35 human donor milk, and 15 formula milk) were collected at the same time as faecal samples. An additional faecal sample was recovered in 16 infants at the age of two years. Samples were plated onto different selective media and one colony per morphology was selected. Isolates were identified by 16S rDNA nucleotide sequence and MALDI-TOF. Antibiotic susceptibility (agar dilution), genetic diversity (RAPD, PFGE and MLST) and virulence factors (only in enterococcal and staphylococcal isolates) were determined by PCR.

A high proportion of antibiotic resistant high-risk clones was detected in both faecal and milk samples during the NICU admittance. Almost all infants were colonized by *Enterococcus faecalis* ST64 and *Enterococcus faecium* ST18 clones, while a wider genetic diversity was observed for the Gram-negative isolates. Multi-resistant high-risk clones were not recovered from the faecal samples of the 2-year-old infants.

In conclusion, the gut of the preterm infants admitted in NICU might be initially colonized by antibiotic-resistant and virulent high-risk lineages, which are later replaced by antibiotic-susceptible community ones.

V. 2. INTRODUCTION

The gut microbiota ecosystem plays an important role in human health and its alterations have been implicated in several systemic diseases, particularly in the early stages of life [1]. After birth, an adequate gut microbiota establishment is essential for both the innate immune system maturation and the creation of a barrier protection from bacterial pathogens [2,3]. Moreover, these first bacterial cells colonizing our gut mucosa might persist in symbiosis with our enterocytes throughout our complete life.

Bacterial gut colonization starts during the intrauterine stage, increasing drastically during the delivery and the first days of life [4-6]. This process can be adversely affected by numerous factors, including antibiotic treatment, caesarean delivery, early separation from the mother, formula feeding, invasive medical treatments and long stays in Neonatal Intensive Care Units (NICU) [7,8]. Some of these factors are usually associated with premature infants who in addition have a delayed or aberrant gut microbiota characterized by poor global bacterial diversity and a low and rather fluctuating *Bifidobacterium* population [9-11].

During their usually long NICU stays, preterm infants are exposed to multi-drug resistant bacteria previously adapted to the hospital environment, that have been recognized as high-risk clones. Most of these high-risk clones belong to the ESKAPE group (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* species) [12,13]. Furthermore, these preterm infants are usually treated with antibiotics which also select the multiresistant bacteria that might colonize their guts.

In the last years, the implementations of metagenomic tools based on 16S rDNA massive sequence has provide large information about the complexity of the gut microbiota ecosystem [14], including the identification of uncultured microorganisms. However, classical and extended techniques based on classical microbiological 74 cultures as culturomics, also provides a comprehensive approach for the human gut microbiota study, and allowed us the further characterization of the bacterial isolates [15].

Although previous studies have assessed the gut colonization of preterm infants, little is known about its evolution after hospital discharge and in their first years of life, particularly around the two years of life, when a mature microbiota has been already established. The aim of the present study is to characterize the bacterial lineages colonizing premature infants during their NICU admittance and their persistence after 2 years, which is the age when the infant's gut starts to contain an adult-like microbiota [16,17].

V. 3. METHODS

V. 3. 1. Subjects and sampling

Twenty-six preterm infants (≤ 32 weeks of gestation and/or $\leq 1,500$ g of weight) born between October 2009 and June 2010 in the 12 de Octubre University Hospital in Madrid were included in the study. Preterm infants with malformations, metabolic diseases or severe conditions were excluded. Relevant demographic and clinical data are summarized in Table 1. The local ethic committee approved the study (reference 09/157), and parents signed the fully informed consent. Following the routine NICU feeding protocols, all infants were preferably fed with their own mother's milk and when this was not possible, with pasteurized human milk from the Milk Bank Unit. When the weight of the infants was $\geq 1,500$ grams and their own mother's milk was unavailable, they received adapted preterm formula. The fortifier FM 85 (Nestle) was used approximately from the fourth week of life with an initial dose of 1 g per 50 ml of milk that was increased to 1 g per 20 ml. Globally, the feeding patterns of the recruited infants were very heterogeneous, a fact that prevented the formation of well-defined feeding groups.

The first spontaneously evacuated meconium after delivery and faecal samples were collected weekly during the first month of life and, then, every 15 days until discharged from the NICU. Samples were collected and immediately stored at -80°C . Once the infants were 2-years-old, an additional faecal sample was also collected although we only were able to contact 16 out of the 26 families.

Mother's milk was extracted using electric pumps and stored either refrigerated for a maximum of 24 h or frozen for up to 6 months. Donor milk, pasteurized at 62.5°C after collection has a shelf life of 3 months. All milks were incubated for 10-15 min at $37-40^{\circ}\text{C}$ and administered to the infant through an orogastric or nasogastric feeding tube using a syringe (manual feeding) or a pump (automatic feeding). Milk samples were always collected after feeding from either the syringe or the extension set connected with the orogastric or nasogastric feeding tube, at the same sampling times as the faecal ones.

Bacterial strains causing a bacteraemia were recovered from the blood samples after their identification was performed at the Department of Microbiology at the 12 de Octubre University Hospital.

V. 3. 2. Culture analysis of the samples

Suitable dilutions of milk and faecal samples obtained during the NICU stay were spread onto Man Rogosa Sharpe (Oxoid, Basingstoke, UK) supplemented or not with L-cysteine (0.5 g/L) (Sigma, St. Louis, USA) for lactic acid bacteria isolation; MacConkey (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) for *Enterobacteriaceae*; Baird Parker

(BioMérieux) for staphylococci, Brain Heart Infusion (Oxoid), Wilkins-Chalgren (Oxoid) and finally in Columbia Nalidixic Acid (BioMérieux) as general agar media plates for isolation of bacterial organisms.

Persistence of selected antibiotic resistant strains acquired in the NICU stay was evaluated in faecal samples of the 2-year-old infants; on the one hand with selective agar media supplemented or not with antibiotics such as Manitol Salt Agar for staphylococci (Difco Laboratories, Detroit, USA) and M-*Enterococcus* agar (Difco) alone and supplemented with 16 µg/ml of ampicillin or 16 µg/ml of erythromycin. On the other hand MacConkey plates were supplemented with 4 µg/ml of ciprofloxacin, or 2 µg/ml of imipenem or 1 µg/ml of cefotaxime.

Plates were aerobically incubated at 37°C for up to 48 h, with the exception of the Wilkins-Chalgren and Man Rogosa Sharpe-cysteine plates that were anaerobically incubated (85% nitrogen, 10% hydrogen, and 5% carbon dioxide) in an anaerobic workstation (Mini-MACS Don Whitley Scientific Limited, Shipley, UK) at 37°C for 48 h. Bacterial counts were recorded as the colony forming units (CFU) per gram of meconium or faeces, or CFU per ml of milk, and transformed to log₁₀ values.

V. 3. 3. Bacterial identification and genotyping

After the initial samples processing, ~4000 colonies were selected including at least one colony per morphology, media and sample. Isolates were subcultured in Brain Heart Infusion and Man Rogosa Sharpe media. In order to avoid repeated isolates, those with the same morphology from the same media and sample were submitted to randomly amplified polymorphic DNA polymerase chain reactions (RAPD-PCR) using the primer OPL5 (5'-ACGCAGGCAC-3') [18]. Finally, at least one representative isolate from each sample, media, and infant was further selected. Bacterial identification was performed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) combined with 16S rDNA PCR amplification and further nucleotide sequencing. Staphylococcal species belonging to the species *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, or *Staphylococcus hominis* were identified by a multiplex PCR method based on the *dnaJ* genes [4].

V. 3. 4. Genetic diversity

The genetic diversity of all selected isolates was assessed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) in a CHEF DR II apparatus (Bio-Rad, Birmingham, UK). To separate *Sma*I digested fragments of enterococci and staphylococci different protocols were applied (2 to 28 s for 24 h; and 5 to 15 s for 10 h and then 15 to 60 s for 13 h, respectively). The chromosomal DNA of *K. pneumoniae* isolates was digested with

*Xba*I enzyme and the electrophoresis conditions were 1 to 40 s for 20 h. Dendrogram analysis of PFGE profiles was performed using the UPGMA method based on the Dice similarity by the Phoretix 5.0 software (Nonlinear Dynamics Ltd., United Kingdom).

Multilocus sequence typing (MLST) schemes were applied for PFGE unrelated strains of *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* and *S. aureus* (www.mlst.net); *Escherichia coli* (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>), and *K. pneumoniae* (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>). The *E. coli* phylogenetic group was also determined by PCR [19]. MLST was represented by Minimum Spanning Tree algorithm using the Phyloviz software (<http://www.phyloviz.net>)

V. 3. 5. Antimicrobial susceptibility testing

Antibiotic susceptibility for ampicillin, cefotaxime, imipenem, gentamicin, kanamycin, erythromycin, tetracycline, ciprofloxacin, and vancomycin was determined only in the selected isolates for PFGE and MLST typing by agar dilution following the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines and breakpoints for each genus/specie [20]. All antibiotics were purchased from Sigma-Aldrich Co. (<http://www.sigmaaldrich.com/>).

V. 3. 6. Virulence factors carriage

Presence of genes encoding for sex pheromones (*ccf*, *cpd*, *cad*, *cob*), cell wall adhesions (*efaAfs*), the aggregation protein (*agg2*), the protein involved in immune evasion (*epsfs*) presence, the extracellular metalloendopeptidase (*gelE*) and the cytolysine (*cylA*) for enterococci were assessed by the procedure described by Eaton and Gasson and modified by Reviriego *et al.*, [21,22].

Carriage of hemolysins (*hla*, *hly*, *hlg*, *hld*) and adhesins (*fmbA*, *clfA*, *sdrE*, *ebpS*) genes in the *S. aureus* isolates was determined by two multiplex PCRs [23], while a single PCR scheme was used for the detection of the genes encoding the exfoliative toxin A (*eta*), toxic shock syndrome toxin (*tst*), adhesion for collagen (*cna*) [24], Pantón-Valentín leukocidin components S and F (*pvl-S/F*) [25], Pantón-Valentín leukocidin components M and F (*pvl-M/F*) [26], staphylococcal enterotoxins (*se-adej*) [27], polysaccharide intracellular adhesion (*icaA*) [28], methicillin resistance (*mecA*) [29], β -lactamase (*blaZ*) [30], and iron siderophore transporter (*sirB*) [31]. At least one isolate per infant and sample obtained during the NICU admission was evaluated for virulence factors carriage.

V. 4. RESULTS

The main demographic and clinical data of the 26 preterm infants are described in Table 1. In all but one infant, the ampicillin-gentamicin combination was administered at birth as empirical treatment, whereas teicoplanin, gentamicin, amikacin and ambisome were used in the septic episodes (Figure 1). Seven infants (27%) had, at least, one bacteraemic episode, and the foremost species involved were coagulase-negative staphylococci (n=5), *Serratia marcescens* (n=3), *K. pneumoniae* (n=2), and *P. aeruginosa* (n=2) (Figure 1).

A total of 296 samples from infant's faeces (144 during the NICU admission and 16 at 2 years-old), 86 from mother's milk, 35 from donor's milk, and 15 from formula's milk were processed. These samples yield ~4000 bacterial isolates and the most numerous species was *E. faecalis* (n=564), followed by *S. epidermidis* (n=420), *S. marcescens* (n=267), *E. coli* (n=252), *K. pneumoniae* (n=228), *E. faecium* (n=108) and *S. aureus* (n=60) (Table 2). Other less abundant but still relevant species belonged to *Enterobacter* (n=71), *Pseudomonas* (n=22), *Acinetobacter* genera (n=16), and others (Supplementary Figure 1).

The number of strains with different PFGE profiles coexisting in the same infant during NICU admittance oscillated between 1 and 5 for *E. faecalis*, 1 and 4 for *E. faecium*, 1 and 10 for *S. aureus*, and 1 and 3 in *K. pneumoniae*. The final collection of unrelated isolates was composed by 67 *E. faecalis*, 48 *E. coli*, 43 *K. pneumoniae*, 22 *E. faecium*, and 17 *S. aureus* isolates, which were submitted to antibiotic susceptibility testing and MLST typing. At this stage, *S. epidermidis* isolates were not studied further due to their high number and the high genetic diversity observed; *Serratia* isolates were excluded from the analysis due to the lack of an MLST scheme, while *Acinetobacter*, *Pseudomonas* and *Enterobacter* isolates were scarcely represented in our population.

The proportion of the high-risk clones detected in the faecal samples during the NICU admittance was considerable: 5 (ST16-CC8, ST21-CC21, ST40-CC40, ST56-CC30 and ST64-CC8) of the 8 STs found among the *E. faecalis* isolates; 2 (ST18-CC18 and ST132-CC18) of 3 in *E. faecium*; 6 (ST8-CC8, ST30-CC30, ST34-CC30, ST45-CC45, ST121-CC121, and ST1490-CC8) of 7 in *S. aureus*, 5 (ST58, ST59, ST69, ST393, ST2904) of 10 in *E. coli*, and finally 5 (ST25, ST29, ST35, ST45, and ST1547, all of them fit into the CC292) of 12 in *K. pneumoniae*. Isolates belonging to these high-risk clones exhibited resistance to most of the studied antibiotics and carried multiple virulent factors (Figure 2).

It is of note that identical STs with the same antibiotic resistance phenotype and the same virulence factors were also detected in the milk and formula samples. In infant 14, *E. faecalis* ST56 and *K. pneumoniae* ST505 were simultaneously detected in faeces and in blood samples during a bacteraemic episode. Infant 12 died in the NICU after a complicated *E. coli* bacteraemia.

Almost all infants were colonized by both *E. faecalis* ST64 (19/24) and *E. faecium* ST18 (9/12) clones, while a wider genetic diversity was observed for the Gram-negative isolates. The predominant clones were ST393 for *E. coli* (8/20) and ST641 for 238 *K. pneumoniae* (8/16) (Figure 3).

Among the *E. faecalis* and *E. faecium* isolates, a high level of antibiotic resistance was observed, especially for tetracycline (96.7% and 97.4%) and erythromycin (68.8% and 92.9%); whereas ampicillin resistance was only detected in *E. faecium* isolates (92.2%). *E. faecalis* ST16 and ST40 clones harbored the highest number of virulence determinants. The most common virulent genes were *gelE* (84.3%), *ccf* (100%) and *efaAfs* (95.7%) in *E. faecalis* isolates, and *epsfs* (24.8%), *gelE* (10.3%) and *ccf* (10.3%) in *E. faecium* isolates (Figure 2).

Globally, *hld*, *fnbA*, *clfA*, and *icaA* were the most frequent virulence genes in the *S. aureus* isolates which were susceptible to the evaluated antibiotics, although 43% of them exhibited resistance to gentamicin (Figure 2).

For the *E. coli* isolates, high percentages of tetracycline resistance 249 (46%), and ciprofloxacin (32%) were observed (Figure 2). As to *K. pneumoniae*, 21% of the isolates were resistant to tetracycline while those belonging to the predominant *K. pneumoniae* ST641 subgroup displayed resistance to ciprofloxacin, imipenem and cefotaxime (Figure 2).

In contrast, isolates from the faecal samples collected from the 2-year-old infants were susceptible to the antibiotics and the proportion of high-risk clones was reduced: 3 (ST16-CC8, ST40-CC40, and ST64-CC8) of 7 in *E. faecalis*; none for *E. faecium* and *S. aureus*, 5 (ST10-CC10, ST57, ST59, ST69, ST131, and ST3570-CC23) of 10 in *E. coli*, and finally 1 (ST1486-CC292) of 2 in *K. pneumoniae* (Figure 2).

V. 5. DISCUSSION

Recent studies have demonstrated that bacterial colonization starts during pregnancy [4,32,33], and in fact the placenta harbours its own microbiota [34]. According to general agreement, the first gut bacterial colonization constitutes the core of the future microbiota that can influence the host's gastrointestinal system and general health throughout life. The definitive gut microbiota is usually established at the age of two years, when the complete diet has introduced.

In the present work, we analyzed the gut microbiota of the preterm infants during their hospital admittance and its maintenance overtime. In contrast to the next generation massive sequence tools, we preferred the classical techniques based on microbiological culture, in order to collect the bacterial strains for further characterization. A high proportion of high-risk clones linked to nosocomial infection were detected both in the milk administered to the infants and in their faeces. As the different milks had been processed and properly stored, the bacterial load could not be attributed to a dramatic and continuous food contamination. In the NICU where the preterm infants were recruited, single-use sterilized and ready-to-use preterm formula are purchased while donor's milk is pasteurized and, then, submitted to strict microbiological controls. In relation to mother's milk that has not been pasteurized, it has been described that contains its own microbiota [35, 36], but its composition and concentration differ considerably from the results obtained in this study. Milk sampling process represents a limitation of our study, because we only collected the milk after the tube or syringe pass, and we cannot ruled out that the milk might be also contaminated previously.

The orogastric or nasogastric feeding tubes, irrespective of the feeding regime, can act as locus for the bacterial attachment and multiplication of numerous opportunistic pathogens [37, 38], and they constitute an important risk factor in the neonatal infections [39]. In agreement with our results, the feeding system might act as a reservoir for the hospital adapted high-risk bacterial clones and contaminate the human and formula milk samples during their passage. After this study, the feeding systems protocol in preterm infants of our NICU was subsequently modified and nowadays the enteral tubes are replaced in a maximum of 48 hours. Other relevant limitation was the lack of maternal samples to complete discharged the existence of these multiresistant clones in their gut or skin microbiota. We hypothesized that the clones have a nosocomial origin, although the maternal source also represents an important option.

On the other hand, sepsis is one of the main causes of death in the NICU, and its prevention and treatment considerably increase the sanitary costs [40]. The main bacteria causing outbreaks in the NICU is *S. epidermidis*, followed by *K. pneumoniae*, *Serratia* spp., *E. coli* and *Enterococcus* spp. Among them, hospital-adapted high-risk clones that exhibit antibiotic resistance and contain virulence factors are of the uppermost relevance [41,42]. In this study, the structure and main characteristics of the

E. faecalis, *E. faecium*, *S. aureus*, *E. coli* and *K. pneumoniae* populations were investigated since they were considered to be the most representative species in the analyzed samples.

Epidemiological molecular studies based on MLST schemes have demonstrated that the nosocomial pathogens usually grouped in particular lineages as CC10 in *E. coli*, ST258 in *K. pneumoniae* [43], CC2/CC9 in *E. faecalis*, CC17 in *E. faecium*, and CC5/CC8/CC30/CC45 in *S. aureus* [44]. In our study the proportion of these high-risk clones detected in the faecal and milk samples was high, although the clonal replacement observed (Figure 2) prevented an epidemic situation in the NICU (Figure 3).

Despite the elevated amount of enterococci isolates obtained during the NICU stay (564 *E. faecalis* and 108 *E. faecium*), a low genetic diversity was observed (8 *E. faecalis* and 3 *E. faecium* STs), whereas the remaining genera showed a higher variability (7 STs of *S. aureus* from 7 infants, 10 STs of *E. coli* and 12 STs of *K. pneumoniae*). Only *E. faecalis* ST64 and ST40 clones persisted during almost all the studied period (Figure 3) which signified that the epidemiological measures implanted routinely in this NICU are adequate including hand-washing protocols, aseptic conditions for milk manipulation, early detection and further isolation of antibiotic multi-resistant carriers, segregation of patients and staff during epidemic outbreaks, and adequate antibiotic politics in consensus with the Microbiology Department.

All but one infant received empirical antibiotic therapy after birth. Although the prophylactic use of antibiotics immediately after birth usually exerts a negative influence on early gut colonization and its protective effect has not been demonstrated [43], a correct antibiotic therapy may be decisive to assure the survival of many preterm infants. However, it is obvious that this routine practice may be a selector for antibiotic resistant isolates that, subsequently, could be overrepresented, on a long-term basis, in the host's gut [44]. Therefore, persistence of the high-risk antibiotic-resistant clones acquired during the NICU stay was evaluated in the same cohort two years after birth. Interestingly, the initial antibiotic-resistant isolates and high-risk clones were scarcely detected but, in turn, other clones, mainly observed in the community and initially non detected, such as *E. coli* ST131, ST10-CC10 or ST3570-CC23, were found.

Previous theories generally assume that the first bacterial isolates reaching the almost “microbial-free” gut during or after birth have a founder effect and, therefore, they tended to persist as members of the gut microbiota throughout life [45]. In contrast, our results showed that after the important selective pressures received early in life by the preterm infants, the initial nosocomial and antibiotic-resistant high-risk lineages had been replaced in their gut by antibiotic-susceptible community lineages when they were 2-year-old, when perturbations of the early microbiota decrease and become adult-like microbiota [16,17].

V. 6. REFERENCES

1. Arrieta MC, Stiemsma LT, Amenyogbe N, Brown EM, Finlay B. The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Front Immunol* 2014; 5:427.
2. Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, *et al.* The long-term stability of the human gut microbiota. *Science* 2013; 341:1237439.
3. Collado MC, Cernada M, Bäuerl C, Vento M, Pérez-Martínez G. Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. *Gut Microbes* 2012; 3:352-365.
4. Jiménez E, Marín ML, Martín R, *et al.* Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol* 2008; 159:187-193.
5. DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, *et al.* Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS ONE* 2008; 3:e3056.
6. Madan JC, Salari RC, Saxena D, *et al.* Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2012; 97:F456-462.
7. Penders J, Thijs C, Vink C, *et al.* Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006; 118:511-521.
8. Murgas Torrazza R, Neu J. The developing intestinal microbiome and its relationship to health and disease in the neonate. *J Perinatol* 2011; 31(Suppl 1):S29–S34.
9. Magne F, Abély M, Boyer F, *et al.* Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by sequences of 16S rRNA genes and PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles. *FEMS Microbiol Ecol* 2006; 57:128-138.
10. Westerbeek E, Berg A, Lafeber H, *et al.* The intestinal bacterial colonisation in preterm infants: A review of the literature. *Clin Nutr* 2006; 25:361–368.
11. Moles L, Gómez M, Heilig H, *et al.* Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS ONE* 2013; 8(6):e66986.
12. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013; 11:297-308.
13. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, *et al.* Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 48:1-12.
14. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; 473:174-180.
15. Lagier JC, Hugon P, Khelaifia S, Fournier PE, La Scola B, Raoult D. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clin Microbiol Rev* 2015; 28:237-64.
16. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, *et al.* Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(Suppl 1):4578-4585.

17. Yatsunenکو T, Rey FE, Manary MJ, *et al.* Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 2012; 486:222-227.
18. Ruiz-Barba JL, Maldonado A, Jiménez-Díaz R. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Anal Biochem* 2005; 347:333-335.
19. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:4555-4558.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement M100-S21. Wayne, PA, USA: CLSI; 2011.
21. Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67:1628-1635.
22. Reviriego C, Eaton T, Martín R, *et al.* Screening of virulence determinants in *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. *J Hum Lact* 2005; 21:131-137.
23. Delgado S, García P, Fernández L, *et al.* Characterization of *Staphylococcus aureus* strains involved in human and bovine mastitis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011; 62:225-235.
24. van Leeuwen WB, Melles DC, Alaidan A, *et al.* Host- and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2005; 187:4584-4591.
25. Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, *et al.* Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect Immun* 2002; 70:631-641.
26. Yamada T, Tochimarū N, Nakasuji S, *et al.* Leukotoxin family genes in *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and prevalence of *lukM lukF-PV* genes by bacteriophages in bovine isolates. *Vet Microbiol* 2005; 110:97-103.
27. Martín MC, González-Hevia MA, Mendoza MC. Usefulness of a two-step PCR procedure for detection and identification of enterotoxigenic staphylococci of bacterial isolates and food samples. *Food Microbiol* 2003; 20:605-610.
28. Peacock SJ, Moore CE, Justice A, *et al.* Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2002; 70:4987-4996.
29. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1032-1035.
30. Martineau F, Picard FJ, Lansac N, *et al.* Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:231-238.
31. Dale SE, Sebulsky MT, Heinrichs DE. Involvement of SirABC in iron-siderophore import in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2004; 186:8356-8362.

32. Jiménez E, Fernández L, Marín ML, *et al.* Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol* 2005; 51:270-274.
33. Rautava S, Luoto R, Salminen S, Isolauri E. Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 9:565-576.
34. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* 2014; 6:237ra65.
35. Martín V, Maldonado-Barragán A, Moles L, *et al.* Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *J Hum Lact* 2012; 28:36-44.
36. Fernández L, Langa S, Martín V, *et al.* The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res* 2013; 69:1-10.
37. Mehall JR, Kite CA, Saltzman DA, Wallett T, Jackson RJ, Smith SD. Prospective study of the incidence and complications of bacterial contamination of enteral feeding in neonates. *J Pediatr Surg.* 2002; 37:1177-1182.
38. Mehall JR, Kite CA, Gilliam CH, Jackson RJ, Smith SD. Enteral feeding tubes are a reservoir for nosocomial antibiotic-resistant pathogens. *J Pediatr Surg* 2002; 37:1011-1012.
39. Hurrell E, Kucerova E, Loughlin M, *et al.* Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonisation by members of the *Enterobacteriaceae*. *BMC Infect Dis* 2009; 9:146.
40. Bhutta ZA, Das JK, Bahl R, *et al.* Can available interventions end preventable deaths in mothers, newborn babies, and stillbirths, and at what cost? *Lancet* 2014; 384:347-370.
41. Willems RJ, Hanage WP, Bessen DE, Feil EJ. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011; 35:872-900.
42. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011; 35:736-755.
43. Tagare A, Kadam S, Vaidya U, Pandit A. Routine antibiotic use in preterm neonates: a randomised controlled trial. *J Hosp Infect* 2010; 74:332-326.
44. Costello EK, Carlisle EM, Bik EM, Morowitz MJ, Relman DA. Microbiome assembly across multiple body sites in low-birthweight infants. *MBio.* 2013; 4:e00782-13.
45. David LA, Materna AC, Friedman J, *et al.* Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome Biol* 2014; 15:R89.

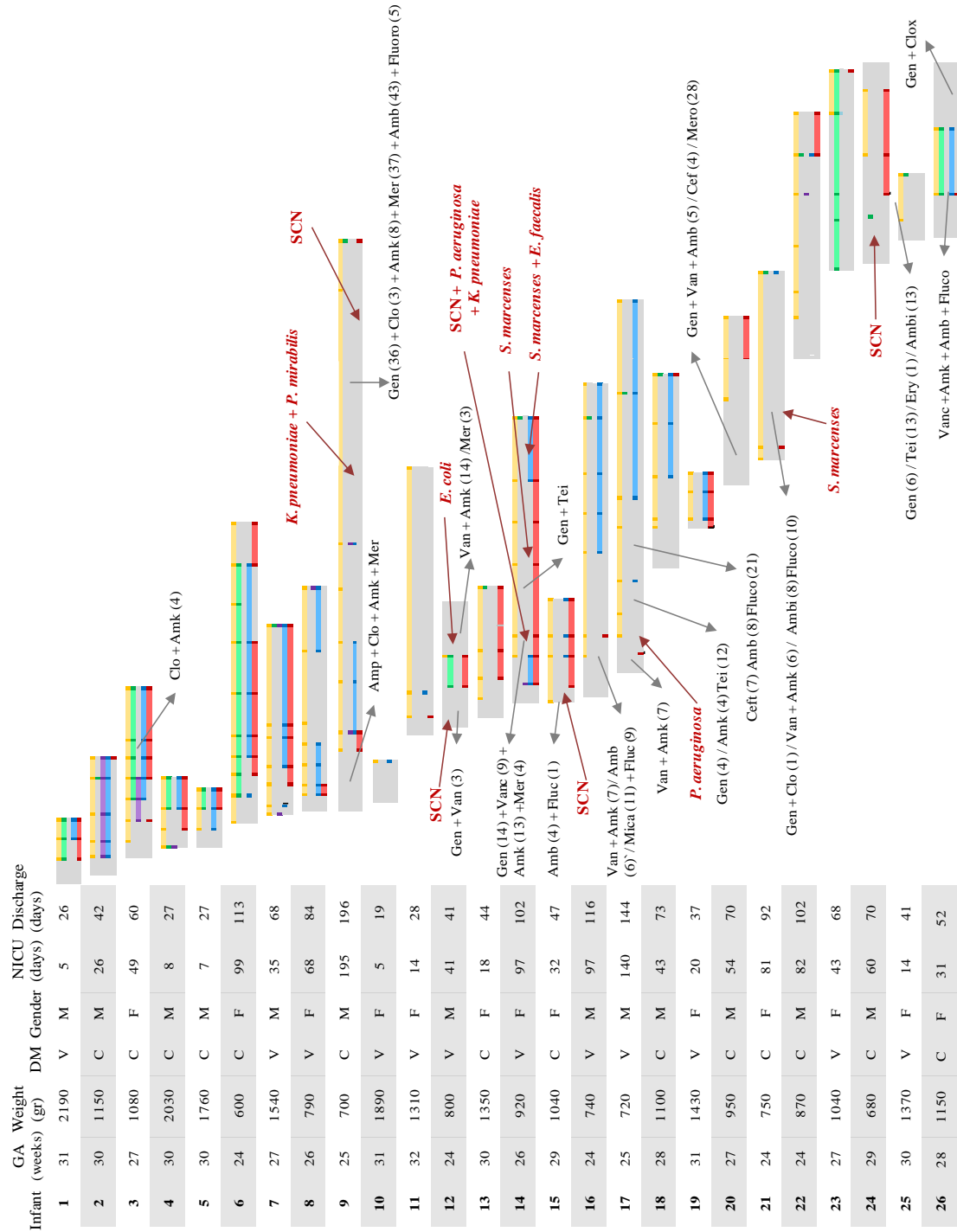
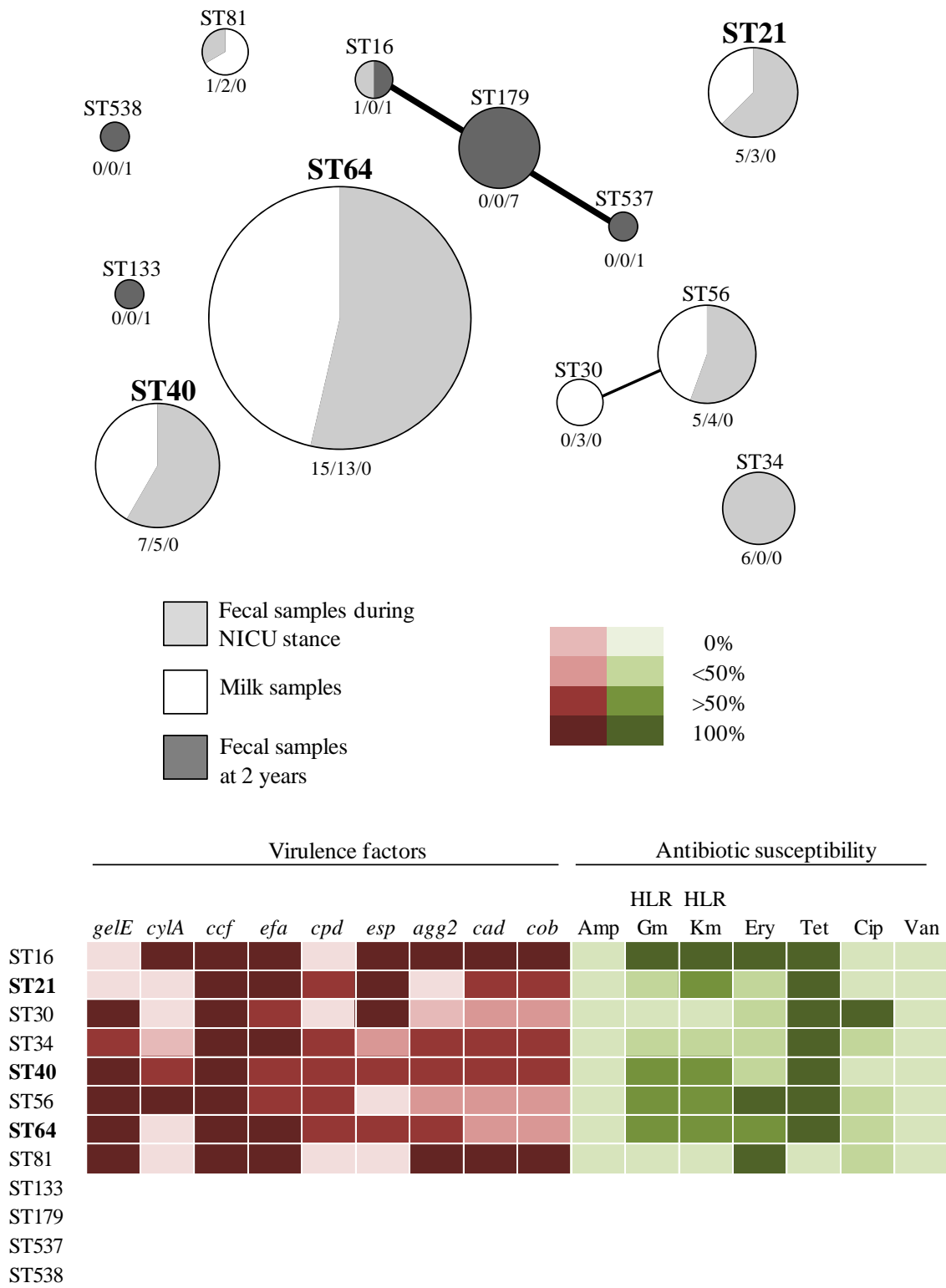


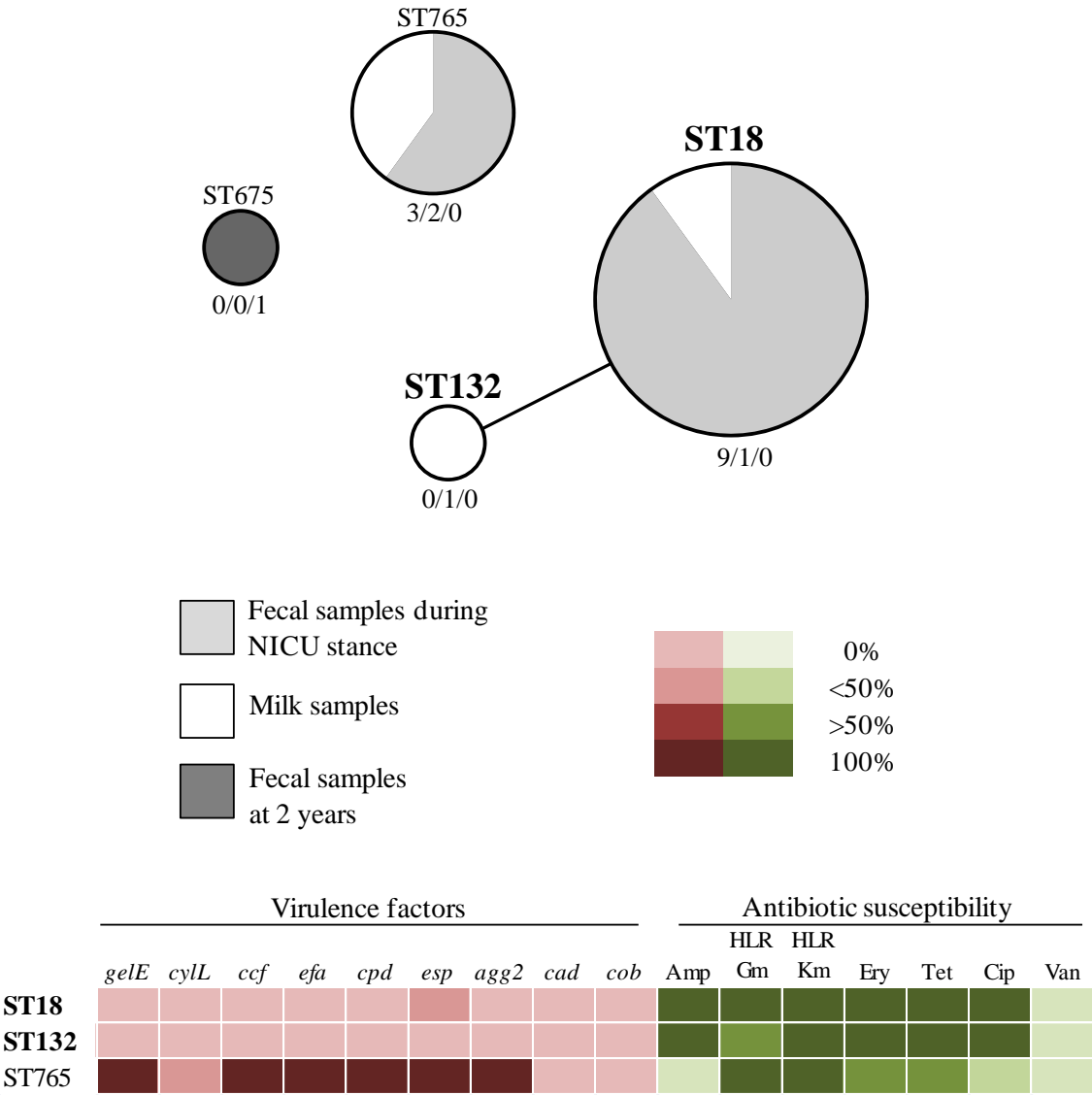
Figure 1. Main characteristic of each preterm infant and their NICU admittance period, including the bacterial pathogens detected in feces represented in the different colors. The grey bar indicates the NICU stay of the infant, the different color bars inside the grey one are the bacterial species detected in the feces of the infant, and the sampling time is pointed in dark inside. Each bacteraemic episode and the corresponding bacterial species is marked with a red arrow. The antibiotic treatment of each infant and the number of days are also represented with grey arrows. Infant 12 is highlighted in red as it was the patient that died.

GA: Gestational Age; DM: Delivery mode, Amb: Ambisome, Amk: Amikacin, Amp: Ampicillin, Clox: Cloxacilina, Ery: Erythromycin, Flu: Fluconazol, Fluoro: Fluorocytosine, Gen: Gentamicin, Mer: Meropenem, Mica: Micafungine, Tei: Teicoplanin, Vanc: Vancomycin.

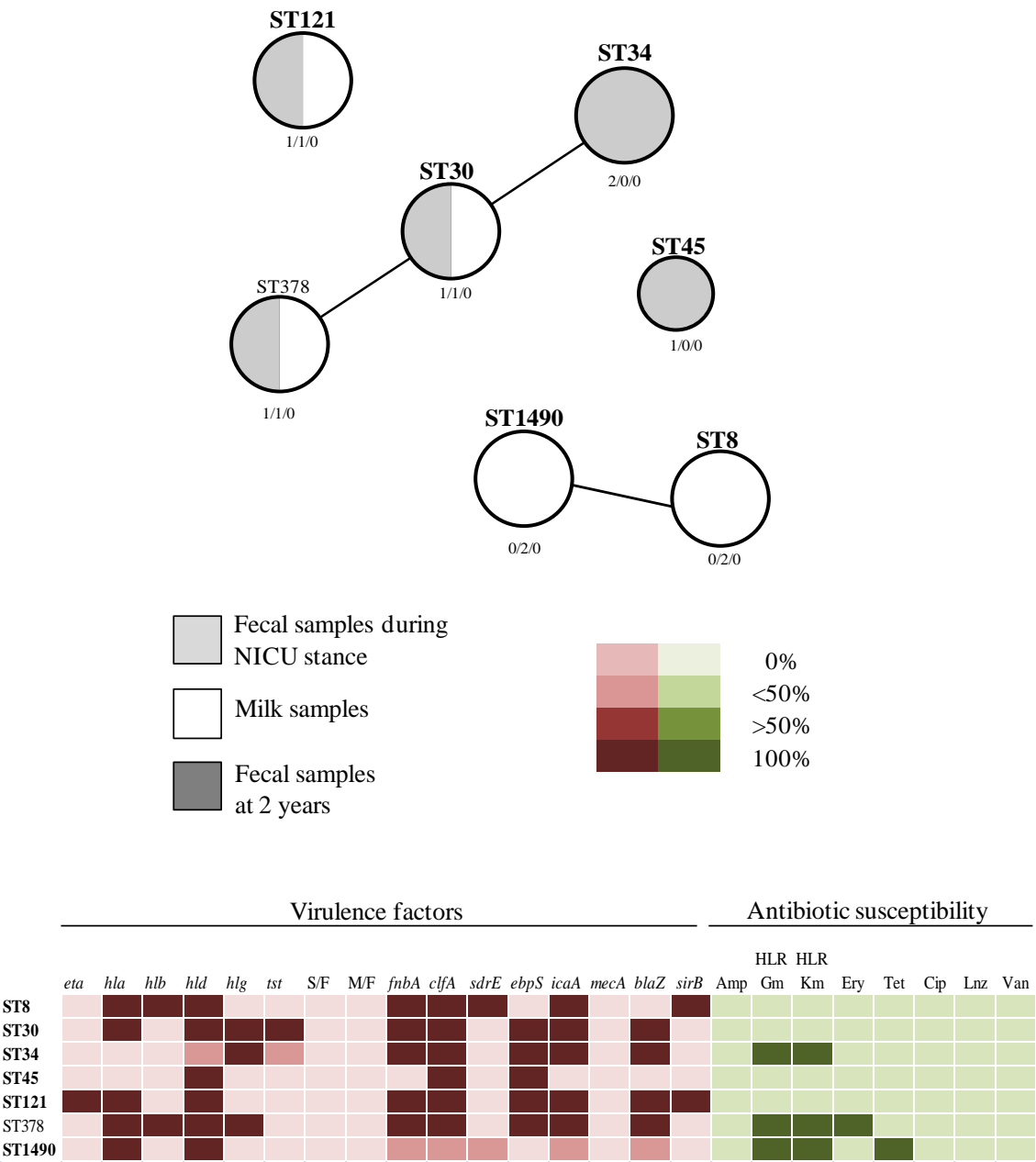
Enterococcus faecalis

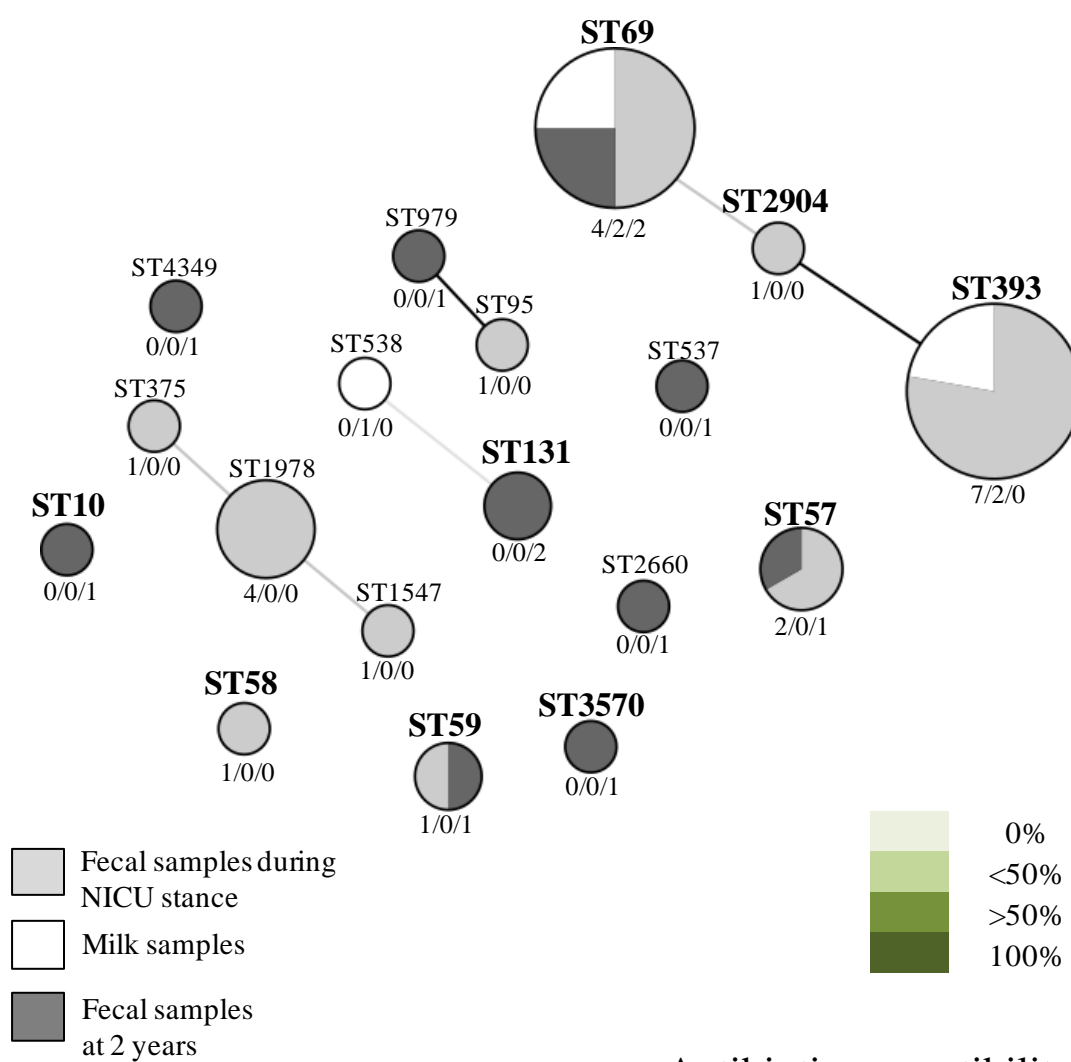


Enterococcus faecium



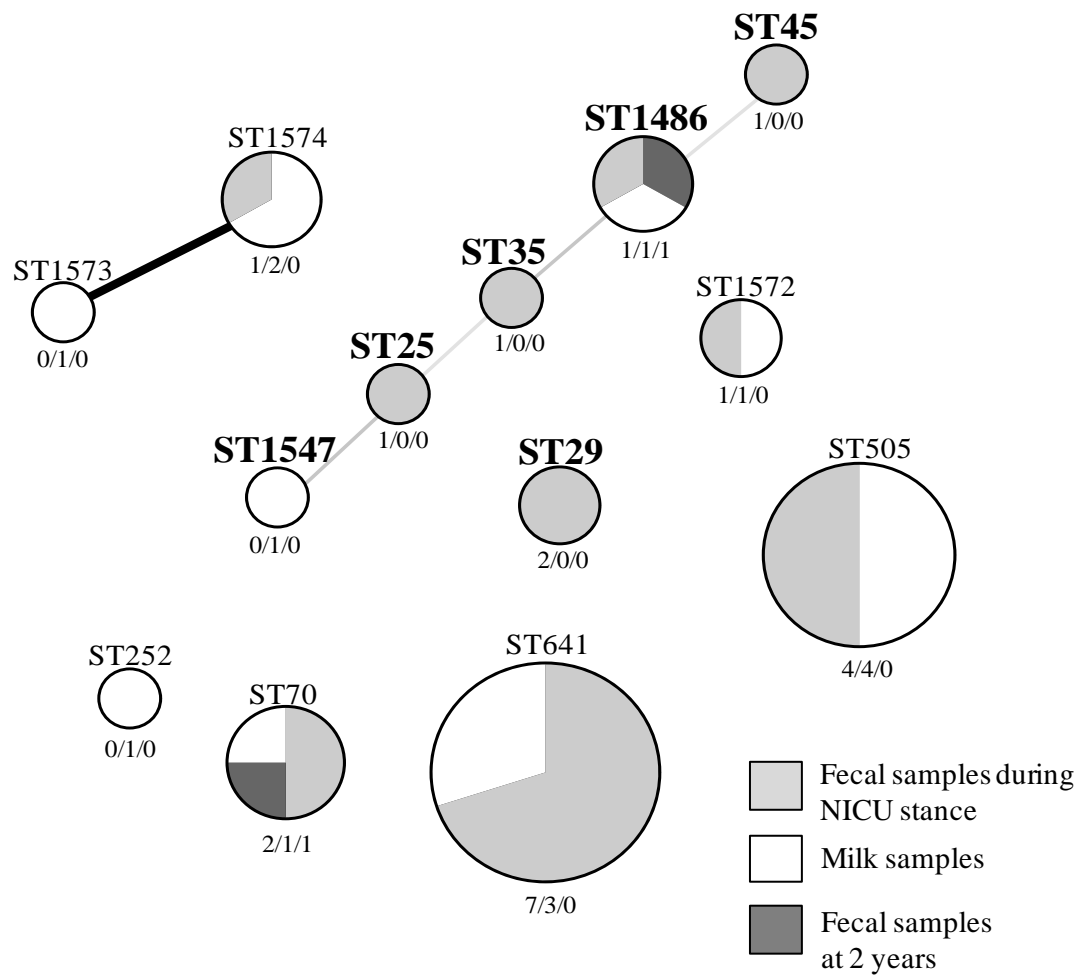
Staphylococcus aureus



Escherichia coli

Antibiotic susceptibility

	Phylogroup	Amp	Cef	Imi	Gen	Tet	Cip
ST57	B2						
ST58	B1/B2						
ST59	D						
ST69	D						
ST95	B2						
ST375	B2						
ST393	D						
ST538	D						
ST1547	B2						
ST1978	B2						
ST2904	B2						

Klebsiella pneumoniae

Antibiotic susceptibility

	Amp	Cef	Imi	Gen	Tet	Cip
ST25	100%	0%	0%	0%	100%	0%
ST29	100%	0%	0%	0%	0%	0%
ST35	100%	0%	0%	100%	0%	0%
ST45	100%	0%	0%	0%	0%	0%
ST70	100%	0%	0%	0%	0%	0%
ST242	100%	0%	0%	0%	0%	0%
ST505	100%	0%	0%	0%	100%	0%
ST641	100%	0%	100%	0%	0%	0%
ST1486	100%	0%	0%	0%	0%	0%
ST1547	100%	0%	0%	0%	0%	0%
ST1572	100%	0%	0%	0%	0%	0%
ST1573	100%	0%	0%	0%	0%	0%
ST1574	100%	0%	0%	0%	100%	0%

Legend:

- 0% (lightest green)
- <50% (medium green)
- >50% (dark green)
- 100% (darkest green)

Figure 2. Summary of the genetic diversity, antibiotic resistance profiles and virulence factors obtained for the different bacterial species. The upper part of the figure represents the genetic diversity obtained by MLST and using the minimum spanning tree algorithm. Each circle represents a MLST clone; its size depends on the number of isolates in that group and its clone number is indicated above the circle, whereas the number below indicates its frequency per origin (feces during NICU stay, milk samples or feces at 2 years). Clones considered as high-risk clones are marked in bold. STs that are genetically related are connected by black lines when they are strongly related and grey when the relation is weak. The antibiotic susceptibility of each clone is represented at the bottom of the figure. For this purpose all isolates belonging to the same ST were grouped, and the antibiotic resistances are represented in function of their frequency (see legend). The same scheme was followed to describe the virulence genes carriage for the gram-positive isolates.

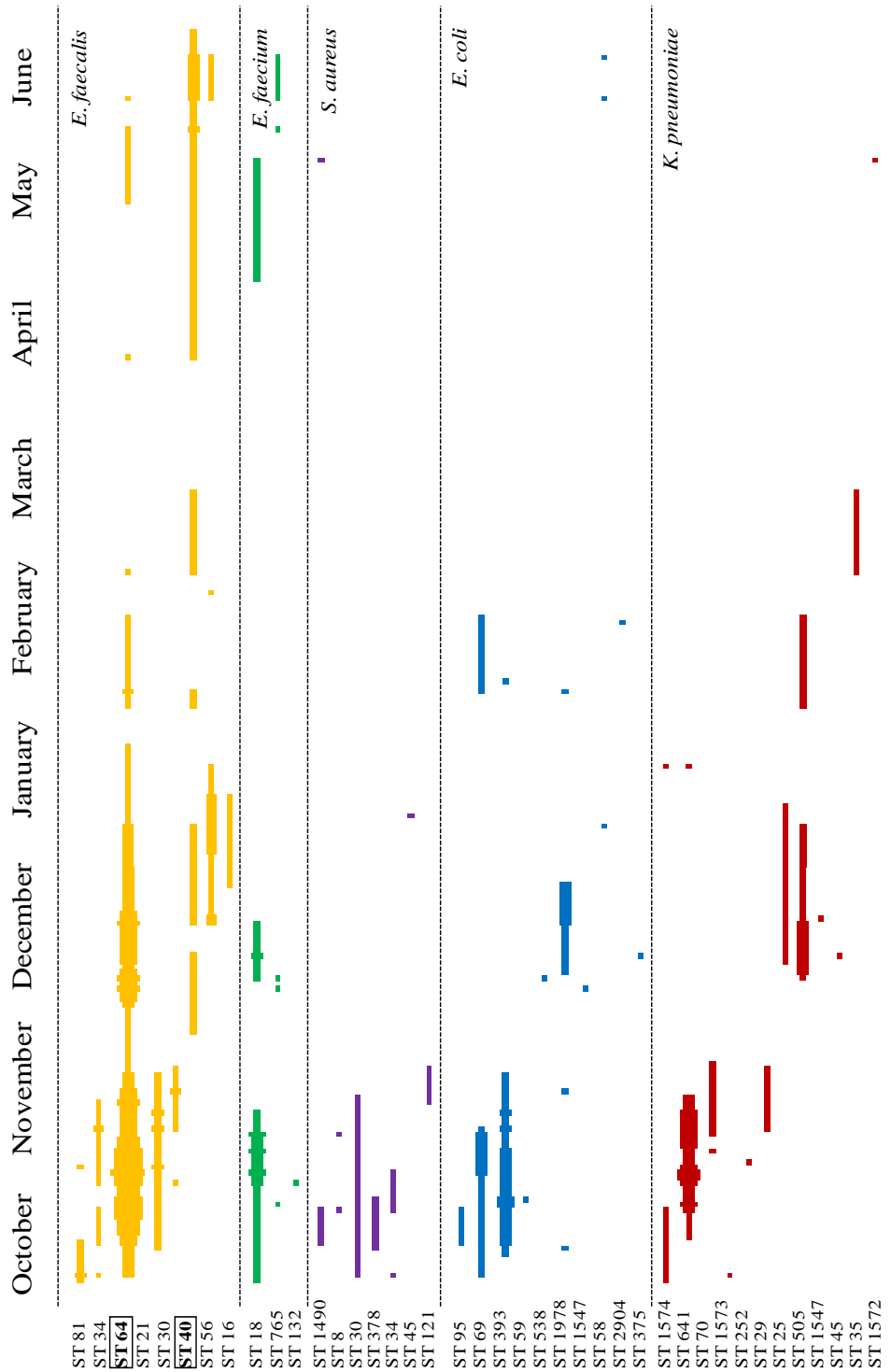


Figure 3. Persistence and frequency of the different ST detected during the studied period in the NICU.

The *E. faecalis* ST64 and ST40 persistent clones are marked.

TABLE 1. Demographic data and clinical characteristics of the 26 preterm infants included in this study

Variable	Number of infants or Mean value (range)
Gestational age (wk)	28 (26.6-28.7)
Male/Female (n)	13/13
Birth weight (g)	1167 (987.3-1347.3)
Z SCORE	-0.23 (-0.50/0.04)
Vaginal/Cesarean section (n)	12/14
Sepsis	7
Prophylactic antibiotherapy at birth	
No	1
Yes	25
<3 days	12
>3 days	13
Days with parenteral nutrition (n=22)	10 (3-12) ^a
Days with enteral feeding tube (n=26)	59 (46-72)
Days with mechanical ventilation (n=16)	14 (0-10) ^a
Days with CPAP ^b (n=21)	18.5 (1.5-39) ^a
Days with oxygen therapy (n=20)	33.5 (1.5-39) ^a
Days in NICU (n=26)	52 (18-81) ^a
Days at Hospital (n=26)	69 (41-92) ^a

^a Median (IQR). ^bCPAP: Continuous positive airway pressure.

wk=weeks, n=number, g=gram.

TABLE 2. Bacterial species and total counts in each type of sample

	Infants (n=26)	Feces (n=144) ^a		Mother's milk (n=86)		Donor Milk (n=35)		Formula Milk (n=15)	
		No.	CFU/g	No.	CFU/ml	No.	CFU/ml	No.	CFU/ml
<i>E. faecalis</i>	24	116	10^3 - 10^{10}	49	10^1 - 10^8	15	10^1 - 10^6	3	10^3 - 10^6
<i>E. faecium</i>	12	47	10^5 - 10^{10}	6	10^4 - 10^6	1	10^1	0	-
<i>S. epidermidis</i>	26	62	10^2 - 10^9	71	10^1 - 10^7	8	10^1 - 10^5	1	10^2
<i>S. aureus</i>	7	18	10^5 - 10^8	8	10^2 - 10^6	4	10^1 - 10^2	1	10^2
<i>E. coli</i>	19	62	10^5 - 10^{10}	10	10^2 - 10^5	2	10^2	1	10^2
<i>K. pneumoniae</i>	16	63	10^5 - 10^{10}	15	10^2 - 10^6	5	10^3 - 10^7	1	10^4
<i>S. marcescens</i>	25	68	10^7 - 10^{10}	56	10^3 - 10^8	10	10^2 - 10^7	4	10^2 - 10^6

^aFecal samples recovered during the NICU admittance, the fecal samples of the 2 year-olds were not included.
CFU/g or CFU/ml, Colony forming units per gram or milliliter.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
	0 7 14 21 42	0 7 14 21 28 42	0 7 14 21 28 35 42 56	0 7 14 21	0 7 14 21	0 14 21 28 35 49 63 70-84	0 7 14 21 28 35 49 63	0 7 14 21 28 35 49 56 63 84	7 14 21 28 42 56 77-101	0 14 21	0 7 14 21	14 21 28	7 14 21	42
<i>Bifidobacterium breve</i>														
<i>Bifidobacterium longum</i>														
<i>Corynebacterium sp.</i>														
<i>Dermabacter hominis</i>														
<i>Microbacterium oxydans</i>														
<i>Micrococcus luteus</i>														
<i>Rothia dentocariosa</i>														
<i>Bacillus sp.</i>														
<i>Enterococcus faecalis</i>														
<i>Enterococcus faecium</i>														
<i>Lactobacillus casei</i>														
<i>Lactobacillus fermentum</i>														
<i>Lactobacillus gasseri</i>														
<i>Lactobacillus salivarius</i>														
<i>Lactococcus lactis</i>														
<i>Leuconostoc citreum</i>														
<i>Staphylococcus aureus</i>														
<i>Staphylococcus epidermidis</i>														
Other <i>Staphylococcus</i>														
<i>Streptococcus agalactiae</i>														
<i>Streptococcus mitis</i>														
Other <i>Streptococcus</i>														
<i>Bacteroides fragilis</i>														
<i>Citrobacter sp.</i>														
<i>Enterobacter cancerogenus</i>														
<i>Enterobacter cloacae</i>														
<i>Enterobacter hormaechei</i>														
<i>Erwinia persicina</i>														
<i>Escherichia coli</i>														
<i>Escherichia fermentans</i>														
<i>Klebsiella granulomatis</i>														
<i>Klebsiella oxytoca</i>														
<i>Klebsiella pneumoniae</i>														
<i>Klebsiella sp.</i>														
<i>Klebsiella varicola</i>														
<i>Morganella morganii</i>														
<i>Pantoea dispersa</i>														
<i>Proteus penneri</i>														
<i>Proteus sp.</i>														
<i>Proteus mirabilis</i>														
<i>Proteus vulgaris</i>														
<i>Pseudomonas fluorescens</i>														
Other <i>Pseudomonas</i>														
<i>Serratia marcescens</i>														
<i>Serratia nematodiphila</i>														
<i>Serratia ureilytica</i>														
<i>Shigella sp.</i>														
<i>Shigella dysenteriae</i>														
Other <i>Shigella</i>														
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>														
<i>Veillonella parvula</i>														
Yeast														
Actinobacteria														
Bacilli														
Bacteroidetes														
Gammaproteobacteria														
Negativicutes														

	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
	0 7 14 21 49 63 84-98	0 7 14 21 28	7 14 21 49 63 70-98	7 14 21 28 35 49 84-126	14 21 35 49 70	0 7 14 21	0 7 14 21	0 7 14 21 35 49 56	0 7 14 21 49 63	0 7 14 21 42 56 70	0 14 21 49 63	7 21 49	21 28
<i>Bifidobacterium breve</i>													
<i>Bifidobacterium longum</i>													
<i>Corynebacterium</i> sp.													
<i>Derrnabacter hominis</i>													
<i>Microbacterium oxydans</i>													
<i>Micrococcus luteus</i>													
<i>Rothia dentocariosa</i>													
<i>Bacillus</i> sp.													
<i>Enterococcus faecalis</i>													
<i>Enterococcus faecium</i>													
<i>Lactobacillus casei</i>													
<i>Lactobacillus fermentum</i>													
<i>Lactobacillus gasseri</i>													
<i>Lactobacillus salivarius</i>													
<i>Lactococcus lactis</i>													
<i>Leuconostoc citreum</i>													
<i>Staphylococcus aureus</i>													
<i>Staphylococcus epidermidis</i>													
Other <i>Staphylococcus</i>													
<i>Streptococcus agalactiae</i>													
<i>Streptococcus mitis</i>													
Other <i>Streptococcus</i>													
<i>Bacteroides fragilis</i>													
<i>Citrobacter</i> sp.													
<i>Enterobacter cancerogenus</i>													
<i>Enterobacter cloacae</i>													
<i>Enterobacter hormaechei</i>													
<i>Erwinia persicina</i>													
<i>Escherichia coli</i>													
<i>Escherichia fergusonii</i>													
<i>Klebsiella granulomatis</i>													
<i>Klebsiella oxytoca</i>													
<i>Klebsiella pneumoniae</i>													
<i>Klebsiella</i> sp.													
<i>Klebsiella variicola</i>													
<i>Morganella morganii</i>													
<i>Pantoea dispersa</i>													
<i>Proteus</i> sp.													
<i>Proteus mirabilis</i>													
<i>Proteus vulgaris</i>													
<i>Pseudomonas fluorescens</i>													
Other <i>Pseudomonas</i>													
<i>Serratia marcescens</i>													
<i>Serratia nematodiphila</i>													
<i>Serratia ureilytica</i>													
<i>Shigella</i> sp.													
<i>Shigella dysenteriae</i>													
Other <i>Shigella</i>													
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>													
<i>Veillonella parvula</i>													
Yeast													
Negativicutes													
<i>Gammaproteobacteria</i>													
<i>Bacteroidetes</i>													
<i>Bacilli</i>													
<i>Actinobacteria</i>													

Supplementary Figure 1. Detection of minority species in each infant and sample.

*VI. Diversidad bacteriana del contenido gástrico de
niños prematuros durante su estancia en la UCIN*



*VI. Bacterial diversity of the gastric content of preterm
infants during their NICU stay*

*Manuscrito Enviado a "Journal of Pediatric
Gastroenterology and Nutrition"*

VI. 1. ABSTRACT

Objective: Studies focused on the stomach microbiota are relatively scarce and, most of them are focused on the adult population. The aim of this work was to describe the bacterial communities inhabiting the gastric content of preterm neonates.

Methods: A total of 13 preterm neonates provided gastric content samples weekly during their hospital stay. Samples were analyzed by using both culture-dependant and independent techniques.

Results: Globally, the dominant species in the gastric content samples were *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. MLST analysis revealed the presence of high-risk clonal complexes associated with the hospital environment, which may colonize enteral feeding tubes. Next generation sequencing analysis showed that only three phyla (*Proteobacteria*, *Firmicutes* and *Actinobacteria*) were present in a percentage higher than 0.5% of the total reads. Dominant genera included *Serratia*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* and *Corynebacterium*.

Conclusions: Gastric content of preterm neonates is dominated by *Proteobacteria* and *Firmicutes*, and harbors high-risk bacterial clones, which may colonize enteral feeding tubes. Later, the preterm gastrointestinal tract is reinoculated with such bacteria when milk or preterm formula are administered through the same system. Therefore, strategies to reduce bacterial contamination of enteral feeding systems should be devised.

Key Words: preterm infants, stomach, gastric content, microbiome, microbiota

VI. 2. INTRODUCTION

The early colonization of the infant digestive tract is a complex process that has relevant consequences for health throughout the life span (1-7). Exposure to a myriad of microorganisms during the perinatal and neonatal periods is followed by a crucial sequence of active events leading to immune tolerance and homeostasis. The discrimination between commensal bacteria and invading pathogens is essential to avoid an inappropriate immune stimulation and/or host infection (8). The dysregulation of these tight interactions between host and microbiota can be responsible for important health disorders, including inflammation and sepsis.

Although full-term, vaginally delivered, breast-fed infant are considered the ideal for the correct development of the gastrointestinal microbiota, in practice there are many factors that may affect the acquisition, composition and evolution of the infant gut microbiota, including gestational age, mode of delivery, diet, environment or medical treatments (9-12). The initial colonization process is particularly challenging in preterm newborns, because of organ immaturity, higher rates of C-section deliveries, frequent use of antibiotics and the stay at the hospital's neonatal intensive care unit (NICU) (13). Under such conditions, it is not strange that preterm infants are frequently associated to an abnormal intestinal colonization pattern (14, 15), a fact that increases susceptibility to disease (16-18). Globally, the intestinal microbiota of preterm infants exhibits a significantly reduced bacterial diversity, an abundance of microorganisms usually related to hospital environments and a reduced proportion of strict anaerobes with respect to facultatives (19-23).

So far, gut has been the subject of most studies concerning gastrointestinal colonization while studies dealing with the stomach's microbiota are relatively scarce and most of them are focused on the adult population with or without *Helicobacter* infection (24-31). In comparison to term neonates, the preterm's stomach is characterized by absence of periodical or rhythmic motility, a slow gastric emptying and a relatively high gastric pH (5.5-7.0), facts that can be determinant in the establishment of the gastric microbiota (32-34). In addition, enteral feeding tubes (NEFTs) are often required to feed these babies but also contributed to the colonization by NICU-associated microorganisms (35). As a consequence, the pass of any nutritional source (either own's mother milk, donor's milk or preterm formula) through the tubes may sweep along bacteria and have a strong impact on the infant intestinal colonization.

In this context, the objectives of this work were, first, to describe the bacterial communities inhabiting the gastric content of preterm neonates using culture-dependant techniques; such approach included the characterization of the bacterial lineages in the case of species frequently involved in preterm sepsis; secondly, to apply the culture-independent techniques to describe the microbiome of a subset of samples.

VI. 3. METHODS

VI. 3. 1. Study Design

Thirteen preterm infants (≤ 32 weeks of gestation and/or $\leq 1,500$ g of weight) born at the Hospital Universitario 12 de Octubre of Madrid (Spain) between October 2009 and June 2010 were included in the study. Preterm infants with malformations, metabolic diseases or severe conditions were excluded. The protocol of this prospective study was approved by the local ethic committee (reference 09/157), and parents signed the informed consent. Relevant demographic and clinical data, such as antibiotherapy, enteral and parenteral nutrition, use of nasogastric tube, need of mechanical ventilation, hospital stay, birth weight, gestational age, gender or delivery mode, are described in Table 1.

Following the routine NICU feeding protocols, all infants were preferably fed with their own mother's milk and when this was not possible, with pasteurized human milk from the Milk Bank Unit. When the weight of the infants was $\geq 1,500$ grams and both types of human milk were unavailable, they received adapted preterm formula. Globally, the feeding patterns of the recruited infants were very heterogeneous, a fact that prevented the formation of well-defined feeding groups. Continuous nasogastric feeding was ordinarily administrated with a pump and intermitent feeding by gavage or pump. The syringe barrels were used as reservoirs that were connected through an external feeding tube (EFT to the infant's NEFTs). Feeding tubes were routinely replaced every 24 h, which means that different feed types could pass through the same tube during such a period.

Gastric content samples (~2 ml) were collected weekly by aspiration, using a sterile syringe, through the NEFT inserted into each baby's stomach. All samples were store at -20°C until analysis.

VI. 3. 2. Culture analysis

Adequate dilutions of gastric content samples were spread onto Man, Rogosa and Sharpe (MRS; Oxoid, Basingstoke, UK) and MRS supplemented with L-cysteine (0.5 g/L) (Sigma, St. Louis, USA) (MRScys) for isolation of lactic acid bacteria, MacConkey (MCK; BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) for isolation of *Enterobacteriaceae*, Baird Parker (BP, BioMérieux) for isolation of staphylococci, Sabouraud Dextrose Chloramphenicol (SDC, BioMérieux) for isolation of yeasts, and Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid), Wilkins-Chalgren (WC, Oxoid) and Columbia Nadilixic Acid Agar (CNA, BioMérieux) as general media for isolation of other bacterial groups. Plates were aerobically incubated at 37°C for up to 48 h, with the exception of SDC plates, which were incubated at 32°C for 96 h, and WC and MRScys

plates, which were incubated (85% nitrogen, 10% hydrogen, 5% carbon dioxide) in an anaerobic workstation (Mini-MACS Don Whitley Scientific Limited, Shipley, UK) at 37°C for 48 h.

VI. 3. 3. Bacterial identification

After bacterial counting at least one representative of each colony morphology was analyzed by optical microscopy and submitted to Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) genotyping using primer OPL5 (5'-ACGCAGGCAC-3') (36) to discard working with duplicate isolates. Then, all those isolates that were isolated from the same sample and that displayed a different RAPD profile were identified. Isolates belonging to the species *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus hominis* were identified by a multiplex PCR based on the *dnaJ* genes (37) while those belonging to the species *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* were identified by a species-specific PCR assay based on *ddl* genes (38). Identification of other bacterial species was performed by 16S rRNA PCR sequencing (ABI Prism 3730, Applied Biosystems) using primers *plb16* (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and *mlb16* (5'-GGCTGCTGGCAGTAGTTAG-3') (39). The resulting sequences (~550 bp) were used to search sequences deposited in the EMBL database using BLAST algorithm and the identity of the isolates was determined on the basis of the highest scores (>98%). The identifications were confirmed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Vitek MS, Biomedieux) at the facilities of ProbiSearch (Tres Cantos, Spain).

VI. 3. 4. Genetic diversity of *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates

The genetic diversity of all the isolates belonging to the species *E. faecalis*, *S. aureus* and *K. pneumoniae* was assessed by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) in a CHEF DR II apparatus (Bio-Rad, Birmingham, UK). To separate *SmaI* digested fragments of enterococci and staphylococci different protocols were applied (2 to 28 s for 24 h and 5 to 15 s for 10 h and then 15 to 60 s for 13 h respectively). The chromosomal DNA of *K. pneumoniae* isolates was digested with *XbaI* enzyme and the electrophoresis conditions were 1 to 40 s for 20 h. Dendrogram analysis of PFGE profiles was performed using the UPGMA method based on the Dice similarity by the Phoretix 5.0 software.

Multilocus sequence typing (MLST) schemes were applied for PFGE-unrelated strains of *E. faecalis* and *S. aureus* (www.mlst.net), *E. coli* (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>), and *K. pneumoniae* (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>).

VI. 3. 5. DNA extraction from the gastric samples

Gastric content samples were thawed at room temperature and centrifuged at 13000 rpm and 4°C for 10 minutes. Then, the pellets were washed with TE buffer and centrifuged under the same conditions. DNA extraction protocol was carried as described previously (23). With the objective of know similarities and more interestingly differences between gastric content samples and infant's feeding, some own's mother milk (OMM) and donor milk (DM) samples were studied. DNA extraction was made following the same protocol.

VI. 3. 6. Next generation sequencing analysis

The DNA samples were sequenced with Illumina technology reads 2×250 at the Unidad de Genómica of the Fundación Parque Científico de Madrid (Spain). PCR amplifications were performed using primer 27F-DegL (5'-GTTYGATYMTGGCTCAG-3') in combination with an equimolar mixture of two reverse primers, 338R-I (5'-GCWGCCTCCCGTAGGAGT-3') and 338R-II (5'-GCWGCCACCCGTAGGTGT-3'), generating ~345 bp amplicons from the V1 to V2 hypervariable regions of 16S rDNA genes. Barcodes used for Illumina sequencing were appended to 3' and 5' terminal ends of PCR amplicons to allow separation of forward and reverse sequences. Barcoded PCR products from all samples were pooled at approximately equal molar DNA concentrations and run on a preparative agarose gel. After excision of the correct size bands, the DNA was electroeluted, precipitated in ethanol and resuspended in TE buffer. One aliquot of pooled, purified, barcoded DNA amplicons was sequenced on a Illumina MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) using pair-end reads.

Primary analysis was performed directly on the MiSeq instrument. MiSeq Reporter (MSR) is Illumina's free software that performs downstream analysis after a run is complete. The MSR Metagenomics 16S rRNA workflow uses the Greengenes database (40) to perform taxonomic classification and delivers genus-level identification. The 16S workflow uses a Bayesian classification method to assign taxonomies and a confidence score to each read. For any given taxonomic level, reads falling below a certain confidence score were not be classified, leading to a certain number of "unclassified" reads

VI. 3. 7. Statistical analysis

The statistical analysis was performed using R 2.15.3 (R-project, www.r-project.org). When data were not normally distributed, medians and interquartile ranges (Q1 and Q3)

were calculated for all sampling times, and means and 95% confidence interval (95% CI) were used for normal distributed data. The Kruskal-Wallis test for non-normal data or one-way ANOVA test when data were normally distributed were used to evaluate the differences between sampling times, in all identified genera detected in gastric samples by culture methods and in dominant and non-dominant genera detected by next generation sequencing. In all cases, *P*-values of <0.05 were considered to be significant.

VI. 4. RESULTS

VI. 4. 1. Characteristics of the preterm population

The 13 infants enrolled in this study had a mean gestational age of 28 weeks (ranging from 24 to 32 weeks) and a mean birth weight of 1,192 g (from 720 to 2,030 g). Approximately half of the infants (n=7) were born by cesarean section, all of them (except one) received antibacterial prophylaxis for, at least, the first 3 days of life, and 8 of them needed mechanical ventilation. Infants were fed either with their own mother's milk, donor milk and/or preterm formula by nasogastric feeding tube for, at least, 21 days after delivery (mean of 62 days). The main characteristics of the infants are presented in Table 1.

VI. 4. 2. Culture-based analysis of the gastric content samples.

A total of 39 gastric content samples collected during the first month of life of 12 of the infants were analyzed by culture-based methods. The samples were very heterogeneous in texture and color, ranging from milky to mucous. No microorganism could be isolated from 25% of the samples (particularly from those collected at day 0). When bacterial growth was detected, total bacterial counts in the general medium BHI oscillated between 4.20 and 5.95 log¹⁰ CFU/mL at day 0 and between 6.00 and 8.13 log¹⁰ CFU/mL at day 28 after birth (Table 2). The dominant bacterial genera were *Enterococcus*, *Staphylococcus* and *Lactobacillus*, among Gram-positive bacteria, and *Klebsiella*, *Serratia* and *Escherichia*, among Gram-negative ones. All of them showed a trend to increase, in both concentration and frequency, from birth onwards although differences over the studied period of time only were statistically significant in the case of the genus *Enterococcus* and other Gram-positive bacteria ($P=0.027$ and $P=0.042$ respectively) (Table 3).

A total of 241 isolates, belonging to 22 different species, were identified. The bacterial profiles showed a high inter-individual variability (Figure 1) and the number of species per sample ranged from 1 to 17 species. Globally, the dominant species were *E. faecalis* and *S. epidermidis*, followed by *S. marcescens*, *E. coli* and *K. pneumoniae*.

MLST analysis revealed the presence of 5 different ST clones among the *E. faecalis* isolates. Most of the infants (67%) were colonized by the clone ST64 while clone ST 56 was detected in two infants and clones ST21, 34 and 40 only in one infant each (Figure 1). All these clones belonged to high-risk clonal complexes and are associated with hospital environments. In relation to *S. aureus*, this species was only isolated in samples of 2 infants (ST378 and ST34, respectively) but both clones are also associated with high-risk clonal complexes. *E. coli* was detected from 4 infants and, two of them were colonized by the same clone (ST393). Finally, *K. pneumoniae* was

detected in 2 infants (clones ST641 and ST505, respectively) and, again, both clones belonged to high-risk clonal complexes (Figure 1).

VI. 4. 3. Metagenomic analysis of the gastric content and milk samples.

A subset of 15 gastric samples was selected for the next generation sequencing analysis. The total number of reads was 205,101. Eight different phyla could be detected in the analyzed samples although only 3 of them (*Proteobacteria*, *Firmicutes* and *Actinobacteria*) were present in a percentage higher than 0.5% of the total reads (Figure 2; Table 4). The analysis of the reads at a lower taxonomical level (Class) revealed the presence of 23 different classes but only 4 of them (*Gammaproteobacteria*, *Bacilli*, *Actinobacteria* and *Alphaproteobacteria*) were represented in a percentage higher than 0.5% of the total reads. Among the 85 different genera which DNA was detected in the samples, 17 of them were represented by, at least, 0.5% of the total reads (Figure 2; Table 4). Dominant genera included *Serratia* and *Klebsiella* (Class *Gammaproteobacteria*), *Streptococcus*, *Staphylococcus* and *Lactobacillus* (Class *Bacilli*), and *Corynebacterium* (Class *Actinobacteria*) (Figure 2; Table 4). Globally, there was a high inter-individual variability at the different taxonomical levels.

Gastric content samples were collected through the nasogastric tubes by syringe aspiration. Since this route was shared with OMM or DM samples, analyses of feeding samples were also performed. Globally, a high degree of similarity between gastric and milk samples was observed at the phylum and class levels (Table 4). At the genus level, the relative abundance of some genera seemed different between both types of samples but the differences do not reached a statistically-significant value (Table 4).

A detailed analysis of the minority bacterial groups (those found in a percentage minor than 0.5% and present in, at least, two samples) was also carried out. The phyla composition of minority groups in the gastric content samples was notably different that that found in the milk samples. *Tenericutes* was the dominant phylum in gastric content while *Cyanobacteria* dominated in the milk samples (Table 5). Differences were also observed at lower taxonomical levels; sequences related to the genera *Facklamia*, *Kocuria*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Balneimonas*, *Caulobacter*, *Micoplana*, *Halomonas*, *Raoultella*, *Shewanella* and *Mycoplasma* were only present in gastric content samples while those belonging to the genera *Dialister* and *Rhizobium* were exclusively found in milk samples (Table 5).

VI. 5. DISCUSSION

In the present work, the microbiota and microbiome of the gastric content of a population of preterm infants during their stay at the NICU were studied. Traditionally, the human stomach was considered to be an inhospitable environment for microorganisms, with limited bacterial colonization and survival, because of the acidic conditions, fast peristalsis and other antimicrobial factors. This led to the assumption that the human stomach did not harbor a complex microbiota. Initially, cultivation of gastric juice or mucosal biopsies identified several members of the *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, and *Fusobacteria* phyla in relatively low abundance (41). Bacterial viable counts in gastric luminal material usually ranges from non-detectable to 10^6 CFU/ml (42) but the values may be strongly dependent on different factors, such as the part of the stomach, the actual gastric pH, diet, fastening time or ethnicity (42, 43). The spectrum of values obtained in this work was also wide and within the range cited above.

The discovery of the genus *Helicobacter*, and the subsequent interest in the mechanisms by which these organisms adapt to the gastric environment, fueled research on the gastric microbiome (24-29, 31). The results of these studies have shown that the stomach's microbiome is far more complex than initially expected and confirmed the dominance of this niche by members of the phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* and *Fusobacteria*, in addition to some belonging to the phylum *Bacteroidetes*. *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Veillonella* and *Prevotella* seem to be the dominant genera in healthy hosts while *Helicobacter* was the most abundant in the human stomach of subjects who tested positive for this organism by using conventional clinical approaches. A vast number of microorganisms ($>10^{10}$ CFU) may enter the human stomach every day and, as a consequence, a clear differentiation between truly resident from transient (swallowed) microbial species is difficult. However, microbiome analysis have revealed that bacterial sequences in the stomach are not simply a random sampling of bacterial sequences from oral, upper respiratory tract or esophageal communities, a fact suggesting that the presence of distinct bacterial communities adapted to the specific gastric environment (24, 44, 45).

In contrast to adults, there is an almost completely lack of data in relation to the microorganisms present in the gastric content of preterm neonates. Obviously, there are many environmental and medical differences among adults, term neonates and preterms and, in addition, there are notable anatomical and physiological differences among the adult, the term neonate and the preterm neonate stomachs; some of these factors may be determinant in the microbial composition of the preterm gastric content (32-34).

The culturomics approach used in this study allowed the isolation and characterization of a relatively ample collection of bacterial isolates belonging to hospital-associated species. Sepsis is one of the main causes of concern in the NICU and, therefore, hospital-adapted high-risk clones that exhibit antibiotic resistance and contain virulence factors are of the uppermost relevance (46, 47). The structure and

main characteristics of the *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli* and *K. pneumoniae* populations were investigated and, for the four species, high-risk clones linked to nosocomial infection were detected (e.g., *E. faecalis* ST64). In a previous study involving the same preterm population, a high proportion of antibiotic resistant high-risk clones was detected in their fecal samples, suggesting a high degree of similarity between the fecal and the gastric microbiotas of preterm neonates. It has been reported that gastric hypochlorhydria in adults leads to an increased presence of intestinal bacteria in gastric samples (31).

Preterm infants are routinely tube-fed until they are physiologically ready for coordination of sucking, swallowing and breathing, which often occurs at 33-36 weeks of postmenstrual age (48, 49). Therefore, any type of feed must be applied through the same feeding device as long as it is placed in a given neonate. Few studies have considered the role of neonatal NEFTs as a site of bacterial colonization and, as a consequence, as a source of bacteria for preterms and the influence of the feeding regime on the pattern of colonization of such devices. However, such studies have revealed the consistent presence of staphylococci (*S. epidermidis*, *S. aureus*), enterococci (*E. faecalis*, *E. faecium*) and *Enterobacteriaceae* (*K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*...), including clones harboring antibiotic resistance genes, from the inner wall of most enteral feeding tubes analyzed so far (35, 50). Aspiration of gastric content through the NEFTs was probably the source of bacteria proliferating in feeding systems and the source of bacteria that contaminated the milk samples. This would explain why, despite interindividual variability, the microbiome profiles of gastric content and milk samples were so similar in this study.

Next generation sequencing analysis revealed the dominance of two phyla (*Firmicutes* and *Proteobacteria*) in our gastric samples, which is in agreement with the results of a previous study (34). However, in the cited work, *Firmicutes* was the most abundant phylum, accounting for 50% of the reads, while *Proteobacteria* was the dominant one in our samples (33%). All the *Firmicutes* genera detected by Milisavljevic et al. (34) were also found in our samples while there was not a complete agreement regarding the bacterial genera belonging to the phylum *Proteobacteria*. In relation to the phylum *Actinobacteria*, *Corynebacterium* was the most abundant genus in both works. Presence of facultative anaerobic bacteria (streptococci, staphylococci, lactic acid bacteria, enterobacteria...) is a distinctive feature in the gastrointestinal tract of neonates while strict anaerobes dominate in the adult gastrointestinal tract. This fact can explain why anaerobic bacteria are also dominant in the adult stomach (24-29, 31).

Globally, the results of this study show that gastric content of preterm neonates is dominated by *Proteobacteria* and *Firmicutes*, and harbors high-risk bacterial clones, which may colonize enteral feeding tubes. Later, the preterm gastrointestinal tract is reinoculated with such bacteria when milk or preterm formula are administered through the same system. Therefore, strategies to reduce bacterial contamination of enteral feeding systems should be devised.

VI. 6. REFERENCES

1. Blaut M, Clavel T. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *J Nutr* 2007; 137(3 Suppl 2):751S-5S.
2. Turnbaugh P.J, Hamady M, Yatsunencko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009; 457 (7228): 480-4.
3. Bäckhed F. The normal gut microbiota in health and disease. *Clin Exp Immunol* 2010; 160: 80-4.
4. Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 2012; 490: 55-60.
5. Morgan X. C, Tickle T. L, Sokol H, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol* 2012; 13: 1-18.
6. Morgan X. C, Segata N, Huttenhower C. Biodiversity and functional genomics in the human microbiome. *Trends in Genetics* 2013; 29 (1): 51-8.
7. Greenblum S, Chiu H-C, Levy R, et al. Towards a predictive systems-level model of the human microbiome: progress, challenges, and opportunities. *Curr Opin Biotechnol* 2013; 24:810-20.
8. Tourneur E, Chassin C. Neonatal immune adaptation of the gut and its role during infections. *Clin Dev Immunol* 2013; 270301: 1-17.
9. Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, et al. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr* 2003; Suppl 91: 48-55.
10. Penders J, Thijs C, Vink C, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006; 118: 511-21.
11. Dominguez-Bello M. G, Costello E. K , Contreras M, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *PNAS* 2010; 106 (26): 11971-5.
12. Murgas Torrazza R, Neu J. The developing intestinal microbiome and its relationship to health and disease in the neonate. *J Perinatol* 2011; 31(suppl 1):S29-S34.
13. Arboleya S, Binetti A, Salazar N, et al. Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiol Ecol* 2012; 79 (3): 763-72.
14. Mshvildadze M, Neu J, Shuster J, et al. Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non–culture-based techniques. *J Pediatr* 2010; 156: 20-5.

15. LaTuga MS, Ellis JC, Cotton CM, et al. Beyond Bacteria: A Study of the Enteric Microbial Consortium in Extremely Low Birth Weight Infants. *PLoS ONE* 2011; 6 (12): e27858.
16. Claud E, Walker A. Hypothesis: inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis. *FASEB J.* 2001; 15: 1398-1403.
17. Cochetiere M-F, Piloquet H, Robert C, et al. Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis in premature infants: the putative role of *Clostridium*. *Pediatr Res* 2004; 56 (3): 366-70.
18. Madan JC, Salari RC, Saxena D, et al. Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2012; 97(6): F456-462.
19. Schwiertz A, Gruhl B, Löbnitz M, et al. Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr Res* 2003; 54 (3): 393-9.
20. Rougé C, Goldenberg O, Ferraris L, et al. Investigation of the intestinal microbiota in preterm infants using different methods. *Anaerobe* 2010; 16: 362-70.
21. Jacquot A, Neveu D, Aujoulat F. Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *J Pediatr* 2011; 158: 390-6.
22. Arboleya S, Solís G, Fernández N, de los Reyes-Gavilán CG, Gueimonde M. Facultative to strict anaerobes ratio in the preterm infant microbiota: A target for intervention? *Gut Microbes.* 2012; 3:583-8.
23. Moles L, Gómez M, Heilig H, et al. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS ONE* 2013; 8(6): e66986.
24. Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, et al. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *PNAS* 2006; 103 (3): 732-7.
25. Dicksved J, Lindberg M, Rosenquist M, et al. Molecular characterization of the stomach microbiota in patients with gastric cancer and in controls. *J Med Microbiol* 2009; 58: 509-16.
26. Engstrand L, Lindberg M. *Helicobacter pylori* and the gastric microbiota. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2013; 27: 39-45.
27. Abreu MT, Peek RM. Gastrointestinal malignancy and the microbiome. *Gastroenterology* 2014; 146: 1534-46.

28. Avilés-Jimenez F, Vazquez-Jimenez F, Medrano-Guzman R, et al. Stomach microbiota composition varies between patients with intestinal type of gastric cancer. *Sci Rep* 2014; 4: 4202, DOI:10.1038/srep04202.
29. Mattarelli P, Brandi G, Calabrese C, et al. Occurrence of Bifidobacteriaceae in human hypochlorhydria stomach. *Microb Ecol Health Dis* 2014; 25: 21379.
30. Okamoto T, Hayashi Y, Mizuno H, et al. Colonization of an acid resistant *Kingella denitrificans* in the stomach may contribute to gastric dysbiosis by *Helicobacter pylori*. *J Infect Chemother* 2014; 20: 169-174.
31. Wang L, Yu X, Zhan S, et al. Participation of microbiota in the development of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20(17): 4948-4952.
32. Thomson M. Disorders of the oesophagus and stomach in infants. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1997; 11 (3): 547-71.
33. Montgomery RK, Mulberg AE, Grand RJ. Development of the human gastrointestinal tract: twenty years of progress. *Gastroenterology* 1999; 116: 702-31.
34. Milisavljevic V, Garg M, Vuletic I, et al. Prospective assessment of the gastroesophageal microbiome in VLBW neonates. *BMC Pediatr* 2013; 13: 49. doi:10.1186/1471-2431-13-49.
35. Hurrell E, Kucerova E, Loughlin M, et al. Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonisation by members of the *Enterobacteriaceae*. *BMC Infect Dis* 2009; 9: 146. doi:10.1186/1471-2334-9-146.
36. Ruiz-Barba JL, Maldonado A, Jiménez-Díaz R. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Anal Biochem* 2005; 347: 333-5.
37. Jiménez E, Delgado S, Maldonado A, et al. *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC Microbiol* 2008; 8: 143.
38. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 24-7.
39. Kullen MJ, Sanozky-Dawes RB, Crowell DC, et al. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *J Appl Microbiol* 2000; 89: 511-516.
40. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72 (7): 5069-72.

41. Adamsson I, Nord CE, Lundquist P, et al. Comparative effects of omeprazole, amoxycillin plus metronidazole versus omeprazole, clarithromycin plus metronidazole on the oral, gastric and intestinal microflora in *Helicobacter pylori*-infected patients. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44 (5): 629-40.
42. Riedel CU, Schwartz A, Egert M. The stomach and small and large intestinal microbiomes. In Marchesi JR (ed), *The Human Microbiota and Microbiome*. CABI International, Wallingford, UK. 2014: 1-18.
43. Maldonado-Contreras A, Goldfarb KC, Godoy-Vitorino F, et al. Structure of the human gastric bacterial community in relation to *Helicobacter pylori* status. *ISME J* 2011; 5 (4): 574-9.
44. Delgado S, Suárez A, Mayo B. Identification, typing and characterisation of *Propionibacterium* strains from healthy mucosa of the human stomach. *Int J Food Microbiol* 2011; 149 (1): 65-72.
45. Delgado S, Leite AMO, Ruas-Madiedo P, et al. Probiotic and technological properties of *Lactobacillus* spp. Strains from the human stomach in the search for potential candidates against gastric microbial dysbiosis. *Front Microbiol* 2014; 5: 766.
46. Willems RJ, Hanage WP, Bessen DE, et al. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011; 35: 872-900.
47. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011; 35: 736-55.
48. Nye C. Transitioning premature infants from gavage to breast. *Neonatal Netw* 2008; 27 (1): 7-13.
49. Whyte RK. Neonatal management and safe discharge of late and moderate preterm infants. *Semin Fetal Neonatal Med* 2012; 17: 153-8.
50. Mehall JR, Kite CA, Saltzman DA, et al. Prospective study of the incidence and complications of bacterial contamination of enteral feeding in neonates. *J Pediatr Surg* 2002; 37: 1177-82.

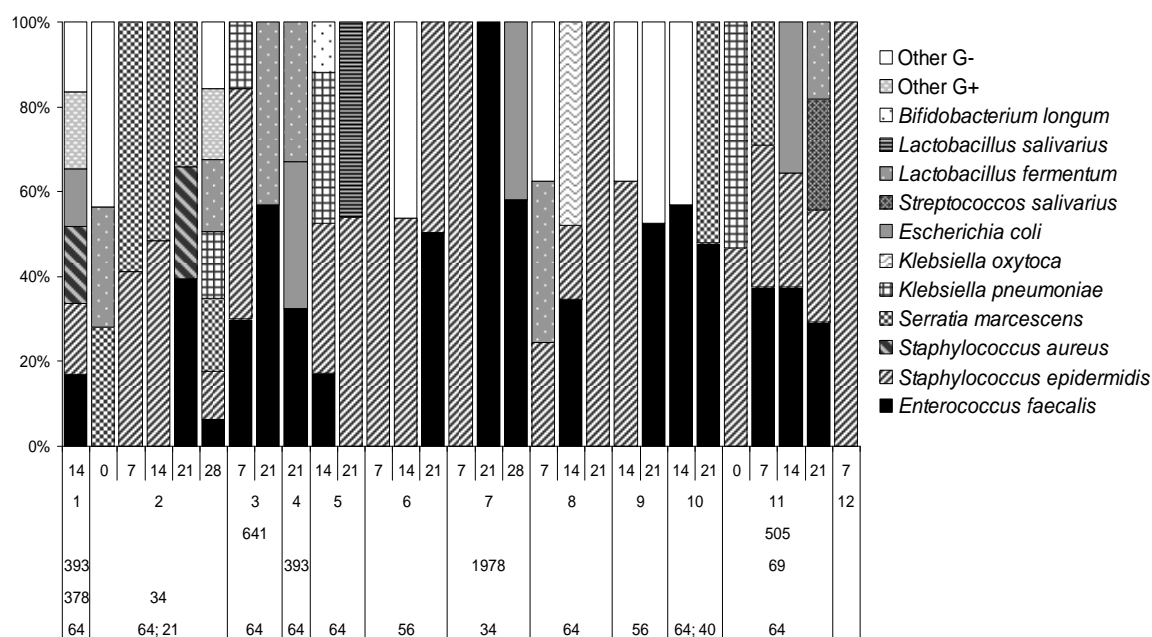


Figure 1. Bacterial species isolated from the gastric content samples analyzed in this study. ST clones of *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli* and *K. pneumoniae* detected by MLST genotyping in each infant and at each sampling time are shown below the graph.

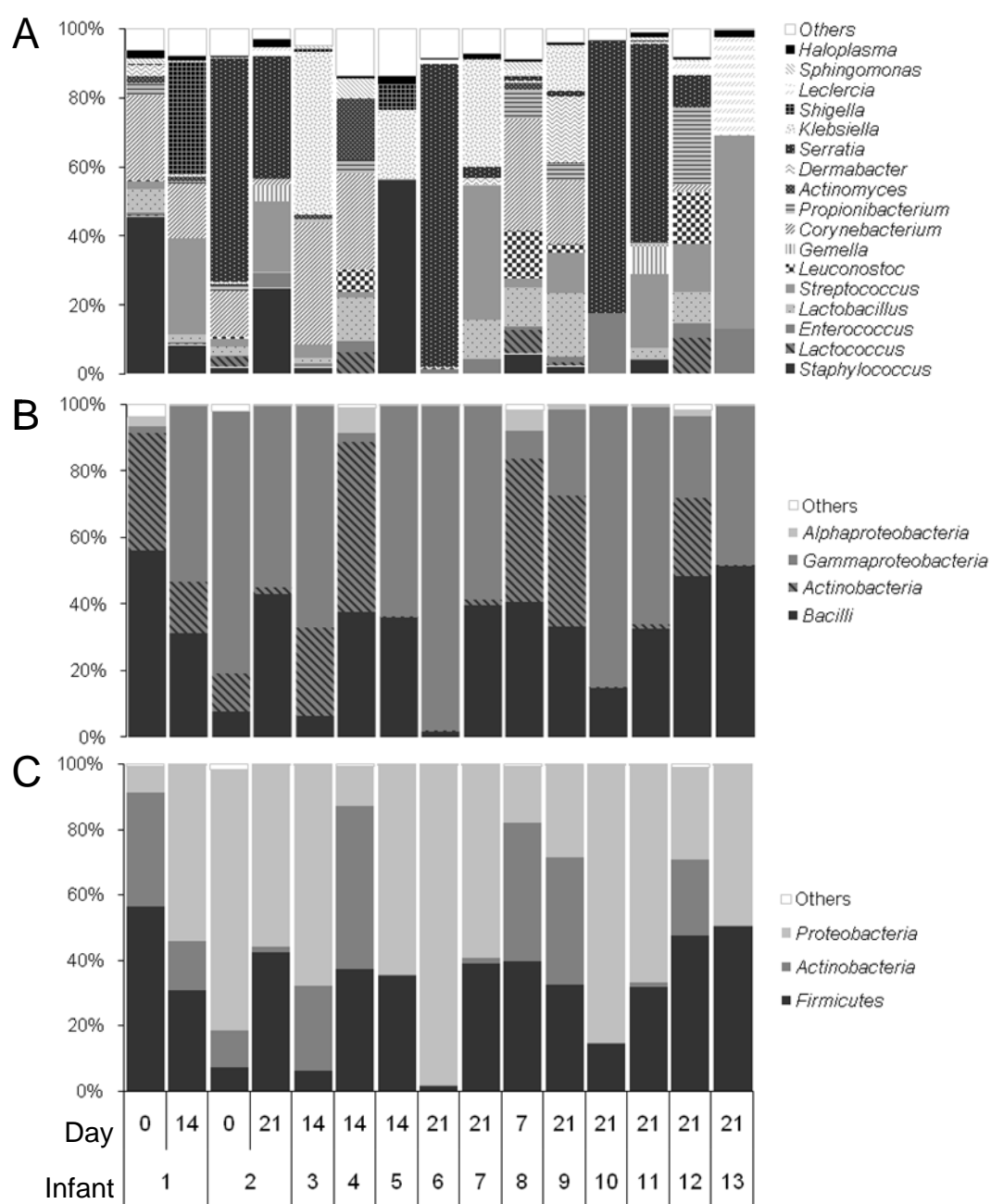


Figure 2. Genera (A), classes (B) and phyla (C) detected in the gastric content samples by pyrosequencing. Only groups accounting for $>0.5\%$ of the sequences are represented.

TABLE 1. Clinical characteristics of the infants included in the study.

Infant	Gestational age (wk)	Gender	Birth weight (g)	Delivery mode	Antibiotherapy (days)	Parenteral nutrition (days)	Enteral feeding tube (days)	Mechanical ventilation (days)	Hospital stay (days)	Periods of sepsis	Sample collection (days of life)	
											Culture	Pyrosequencing
1	30	M	1,550	Cesarean section	3	5	38	0	42	-	0, 14, 21	0, 14
2	27	F	1,080	Cesarean section	9	3	48	0,5	60	-	0, 7, 14, 21, 28	0, 21
3	30	M	2,030	Cesarean section	3	0	26	2	27	-	0,7,14,21	14
4	30	M	1,760	Vaginal	0	0	26	0	27	-	0,7,14,21	14
5	32	F	1,310	Vaginal	3	0	21	0	28	-	0,14,21	14
6	26	F	920	Vaginal	33	8	97	26	102	2	7,14,21	21
7	29	F	1,040	Cesarean section	7	5	45	0	47	-	7, 21, 28	21
8	24	M	740	Vaginal	27	13	112	35	116	1	7,14,21	21
9	25	M	720	Vaginal	38	10	144	140	144	1	14, 21	21
10	28	M	1,100	Cesarean section	7	14	62	10	73	-	14, 21	21
11	31	F	1,430	Vaginal	3	4	35	0	37	-	0, 7, 14, 21	21
12	27	M	950	Cesarean section	3	8	62	0,04	70	-	7, 14, 21	28
13	24	M	870	Cesarean section	29	12	90	37	102	-	21	21
Mean (95% IC)	27.9 (26.3; 29.5)	62% M	1192 (950; 1435)	46% Vaginal	12.7 (4.4; 20.9)	6.3 (3.3; 9.3)	62.0 (39.1; 84.9)	0.5 (0- 26)*	67.3 (44.2; 90.4)	23% Sepsis		
*Median (IQR)												

TABLE 2. Bacterial counts in gastric content samples

Medium	Type of sample	No. Positive samples (%)	Mean (95% CI)	Range of values	
				Minimum	Maximum
BHI	0 (n=6)	2 (33%)	5.08 (5.02; 5.13)	4.20	5.95
	7 (n=8)	5 (63%)	4.11 (1.27; 6.94)	1.69	7.18
	14 (n=11)	8 (73%)	5.93 (5.90; 5.96)	3.70	7.81
	21 (n=11)	9 (82%)	4.68 (4.64; 4.72)	1.70	6.96
	28 (n=2)	2 (100%)	7.07 (7.00; 7.13)	6.00	8.13
WC	0 (n=6)	2 (33%)	4.56 (4.44; 4.67)	2.70	6.41
	7 (n=8)	5 (63%)	4.69 (1.61; 7.77)	3.38	8.90
	14 (n=11)	8 (73%)	6.18 (6.15; 6.21)	3.85	7.79
	21 (n=11)	8 (73%)	5.43 (5.38; 5.47)	2.18	7.10
	28 (n=2)	2 (100%)	7.72 (7.61; 7.82)	6.00	9.43
CNA	0 (n=6)	1 (17%)	2.65	2.65	2.65
	7 (n=8)	5 (63%)	5.12 (1.64; 6.64)	2.65	6.41
	14 (n=11)	8 (73%)	5.54 (5.51; 5.56)	4.00	6.97
	21 (n=11)	9 (82%)	4.78 (4.74; 4.83)	2.00	7.01
	28 (n=2)	2 (100%)	7.37 (7.28; 7.46)	6.00	8.74
BP	0 (n=6)	1 (17%)	3.48	3.48	3.48
	7 (n=8)	4 (50%)	3.98 (0.71; 7.26)	5.18	6.47
	14 (n=11)	7 (64%)	5.22 (5.18; 5.26)	2.40	6.90
	21 (n=11)	4 (36%)	4.52 (4.46; 4.59)	1.70	6.23
	28 (n=2)	2 (100%)	4.85 (4.78; 4.91)	3.85	5.85
MCK	0 (n=6)	1 (17%)	5.33	5.33	5.33
	7 (n=8)	4 (50%)	3.12 (0.53; 5.70)	3.70	5.00
	14 (n=11)	8 (73%)	5.20 (5.17; 5.24)	2.98	6.88
	21 (n=11)	5 (45%)	5.24 (5.20; 5.29)	2.85	6.86
	28 (n=2)	2 (100%)	5.95 (5.75; 6.14)	2.78	9.11
MRS	0 (n=6)	1 (17%)	3.40	3.40	3.40
	7 (n=8)	4 (50%)	3.00 (0.15; 5.85)	2.93	6.84
	14 (n=11)	7 (64%)	5.37 (5.33; 5.41)	2.30	6.89
	21 (n=11)	7 (64%)	5.59 (5.55; 5.63)	2.00	6.82
	28 (n=2)	2 (100%)	4.66 (4.58; 4.75)	3.32	6.00
MRScys	0 (n=6)	2 (25%)	2.70	2.70	2.70
	7 (n=8)	2 (25%)	1.47 (- 1.21; 4.15)	2.60	6.23
	14 (n=11)	5 (45%)	5.22 (5.18; 5.26)	2.95	6.68
	21 (n=11)	6 (55%)	4.94 (4.90; 4.98)	2.00	6.69
	28 (n=2)	2 (100%)	7.42 (7.33; 7.51)	6.00	8.85
SDC	0 (n=6)	0 (0%)	-	0.00	0.00
	7 (n=8)	2 (25%)	1.81 (- 1.41; 5.03)	3.48	7.40
	14 (n=11)	3 (27%)	5.19 (5.12; 5.27)	2.81	6.76
	21 (n=11)	5 (45%)	5.06 (5.00; 5.13)	1.70	7.10
	28 (n=2)	1 (50%)	5.28	5.28	5.28

TABLE 3. Microbial groups isolated from gastric content of preterm neonates

	Day 0 (n=6)			Day 7 (n=8)			Day 14 (n=11)			Day 21 (n=11)			Day 28 (n=2)		
	Number of positive samples (%)	Bacterial Counts Median (IQR)	Number of positive samples (%)	Bacterial Counts Median (IQR)	Number of positive samples (%)	Bacterial Counts Median (IQR)	Bacterial Counts Median (IQR)	Number of positive samples (%)	Bacterial Counts Median (IQR)	Bacterial Counts Median (IQR)	Number of positive samples (%)	Bacterial Counts Median (IQR)	Bacterial Counts Median (IQR)	Number of positive samples (%)	p.value*
Staphylococcus	1 (17)	5.18	6 (75)	5.29 (1.27- 5.99)	7 (64)	5.81 (3.35- 6.23)	5 (45)	4.02 (2.30- 5.85)	1 (50)	5.85	0.245				
Enterococcus	0 (0)	-	2 (25)	4.66 (3.23- 6.09)	5 (45)	4.19 (3.40- 4.74)	8 (73)	6.25 (4.26- 6.63)	2 (100)	3.58 (3.45- 3.71)	0.027				
Streptococcus	0 (0)	-	0 (0)	-	0 (0)	-	1 (9)	5.78	0 (0)	-	0.653				
Lactobacillus	1 (17)	2.70	1 (13)	2.65	0 (0)	-	4 (36)	4.47 (3.43- 5.02)	1 (50)	8.85	0.139				
Bifidobacterium	0 (0)	-	0 (0)	-	1 (9)	2.00	0 (0)	-	0 (0)	-	0.653				
Other G+	0 (0)	-	0 (0)	-	1 (9)	3.70	0 (0)	-	1 (50)	8.74	0.042				
Klebsiella	1 (17)	5.88	1 (13)	1.70	2 (18)	6.30 (6.17- 6.42)	0 (0)	-	1 (50)	8.18	0.292				
Serratia	1 (17)	2.70	2 (25)	6.05 (4.70- 7.40)	1 (9)	6.88	2 (18)	6.14 (5.66- 6.62)	1 (50)	9.06	0.575				
E. coli	0 (0)	-	0 (0)	-	2 (18)	3.33 (3.01- 3.64)	1 (9)	5.22	1 (50)	2.78	0.269				
Other G-	1 (17)	4.19	1 (13)	2.60	4 (36)	4.57 (3.94- 5.00)	1 (9)	2.18	1 (50)	8.18	0.281				

*Friedman test

Other Gram-positive bacteria included the following genera: *Micrococcus* and *Actinobacterium*.Other Gram-negative bacteria included the following genera: *Enterobacter*, *Stenotrophomonas* and *Pantoea*.

TABLE 4. Relative abundance of bacterial genus detected in gastric content and human milk samples using pyrosequencing. Majority genera (>0.5%)

Phylum	Class	Genus	Gastric content Median (n= 15)	OOM Median (n= 5)	DM Median (n= 3)	p. value 1	p. value 2
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomyces</i>	0.58	2.16	0.36	0.197	0.735
		<i>Bifidobacterium</i>	0.46	1.62	0.20	0.558	0.127
		<i>Corynebacterium</i>	11.21	0.98	0.28	0.602	0.311
		<i>Dermabacter</i>	0.54	2.16	0.32	0.439	0.414
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Prevotella</i>	0.28	5.87	0.13	-	0.221
	<i>Flavobacterium</i>	<i>Chryseobacterium</i>	-	0.22*	0.84*	-	-
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Propionibacterium</i>	0.92	3.63	1.38	0.514	0.484
		<i>Enterococcus</i>	1.04	0.18	0.27	0.131	0.341
		<i>Gemella</i>	3.32*	-	0.09*		0.485**
		<i>Lactobacillus</i>	4.16	0.33	1.26	0.115	0.312
		<i>Lactococcus</i>	4.24*	5.79*	20.14*	0.515**	0.170**
		<i>Leuconostoc</i>	1.97	0.34	0.67	0.305	0.380
		<i>Staphylococcus</i>	2.41	17.12	7.11	0.833	0.112
		<i>Streptococcus</i>	9.07	0.10	5.10	0.122	0.062
	<i>Clostridia</i>	<i>Finegoldia</i>	0.42	1.43	0.65	0.655	-
		<i>Peptoniphilus</i>	0.41	1.96	0.11	1.000	-
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Agrobacterium</i>	0.06*	0.40*	1.12*	0.604**	0.180**
	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Dickeya</i>	0.14	1.39	0.98	0.296	0.117
		<i>Pseudomonas</i>	0.89	0.12	13.59	0.683	0.307
		<i>Sphingomonas</i>	0.71	0.12	0.27	0.229	0.157
		<i>Acinetobacter</i>	0.36	3.14	4.14	0.089	0.079
		<i>Klebsiella</i>	9.59	1.84	0.79	0.380	-
		<i>Leclercia</i>	1.39	0.05	0.22	0.134	0.739
		<i>Serratia</i>	15.68	56.86	15.68	0.133	-
		<i>Shigella</i>	0.57	1.34	0.79	0.655	0.770
<i>Tenericutes</i>	<i>Mollicutes</i>	<i>Haloplasma</i>	0.78	1.29	1.44	0.086	-

p.value 1: Kruskal- Wallis of Gastric content and OMM comparison

p.value 2: Kruskal- Wallis of Gastric content and DM comparison

*Mean of the log-transformed signal intensities.

**ANOVA test

TABLE 5. Relative abundance of bacterial genus detected in gastric content and human milk samples using pyrosequencing. Minority genera (<0.5%, present in at least two samples)

Phylum	Class	Genus	Gastric content Median (n= 15)	OOM Median (n= 5)	DM Median (n= 3)	p. value 1	p. value 2
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>kocuria</i>	0.07	-	-	-	-
		<i>Micrococcus</i>	0.14	0.06	-	1.000	-
		<i>Rothia</i>	0.10	0.13	0.31	-	-
		<i>Parascardovia</i>	0.06*	0.69*	-	0.010**	-
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Pedobacter</i>	0.23	0.15	0.16	0.643	0.064
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Aerococcus</i>	0.38*	-	-	-	-
		<i>Anoxybacillus</i>	0.08	0.06	-	-	-
		<i>Bacillus</i>	0.33*	-	0.50*	-	0.180
		<i>Facklamia</i>	0.27*	-	-	-	-
		<i>Melissococcus</i>	0.16	-	0.16	-	-
		<i>Pediococcus</i>	0.07	-	-	-	-
	<i>Clostridia</i>	<i>Anaerococcus</i>	0.54	1.79	-	-	-
		<i>Clostridium</i>	0.18	-	0.20	-	-
	<i>Negativicutes</i>	<i>Dialister</i>	-	1.95	-	-	-
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Balneimonas</i>	0.65*	-	-	-	-
		<i>Bradyrhizobium</i>	0.17*	-	0.09*	-	0.479**
		<i>Brevundimonas</i>	0.09*	-	0.06*	-	0.180**
		<i>Caulobacter</i>	0.18	-	-	-	-
		<i>Methylobacterium</i>	0.11*	-	0.11*	-	0.655**
		<i>Mycoplana</i>	0.06*	-	-	-	-
		<i>Novosphingobium</i>	0.31*	0.29*	0.15*	0.916**	0.195**
		<i>Rhizobium</i>	-	-	0.08	-	-
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Massilia</i>	0.27*	0.09*	0.24*	0.5072**	-
		<i>Arenimonas</i>	0.14	0.37	-	-	-
	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Averyella</i>	0.14	0.18	0.09	0.518	0.814
		<i>Cronobacter</i>	0.22	0.26	-	0.655	-
		<i>Enterobacter</i>	0.16*	0.14*	0.09*	0.946**	-
		<i>Escherichia</i>	1.12	0.28	0.25	0.724	0.724
		<i>Halomonas</i>	0.05	-	-	-	-
		<i>Raoultella</i>	0.33*	-	-	-	-
		<i>Shewanella</i>	0.12*	-	-	-	-
		<i>Simidua</i>	0.18*	0.31*	0.24*	0.067**	0.031**
		<i>Stenotrophomonas</i>	0.14	1.09	0.22	0.165	-
<i>Tenericutes</i>	<i>Mollicutes</i>	<i>Mycoplasma</i>	0.96	-	-	-	-

p.value 1: Kruskal- Wallis of Gastric content and OMM comparison

p.value 2: Kruskal- Wallis of Gastric content and DM comparison

*Mean of the log-transformed signal intensities.

**ANOVA test

*VII. Propiedades bacteriológicas, bioquímicas e
inmunológicas del calostro y leche madura de madres de
recién nacidos extremadamente prematuros*



*VII. Bacteriological, biochemical, and immunological
properties of colostrum and mature milk from mothers
of extremely preterm infants*

*Artículo Publicado en "Journal of Pediatric
Gastroenterology and Nutrition"*

Bacteriological, Biochemical, and Immunological Properties of Colostrum and Mature Milk From Mothers of Extremely Preterm Infants

*Laura Moles, [†]Susana Manzano, *Leonides Fernández, [‡]Antonia Montilla, [‡]Nieves Corzo, [§]Susana Ares, *Juan M. Rodríguez, and [†]Irene Espinosa-Martos

ABSTRACT

Objectives: The objective of this work was to elucidate the influence of extremely premature birth (gestational age 24–27 weeks) on the microbiological, biochemical, and immunological composition of colostrum and mature milk.

Methods: A total of 17 colostrum and 34 mature milk samples were provided by the 22 mothers of extremely preterms who participated in this study. Bacterial diversity was assessed by culture-based methods, whereas the concentration of lactose, glucose, and *myo*-inositol was determined by a gas chromatography procedure. Finally, the concentrations of a wide spectrum of cytokines, chemokines, growth factors, and immunoglobulins were measured using a multiplex system.

Results: Bacteria were present in a small percentage of the colostrum and milk samples. Staphylococci, streptococci, and lactobacilli were the main bacterial groups isolated from colostrum, and they could be also isolated, together with enterococci and enterobacteria, from some mature milk samples. The colostrum concentrations of lactose and glucose were significantly lower than those found in mature milk, whereas the contrary was observed in relation to *myo*-inositol. The concentrations of most cytokines and immunoglobulins in colostrum were higher than in mature milk, and the differences were significant for immunoglobulin G₃, immunoglobulin G₄, interleukin (IL)-6, interferon- γ , interleukin-4 (IL-4), IL-13, IL-17, macrophage-monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 β .

Conclusions: The bacteriological, biochemical, and immunological content of colostrum and mature milk from mothers of extremely preterm infants is particularly valuable for such infants. Efforts have to be made to try that preterm neonates receive milk from their own mothers or from donors matching, as much as possible, the gestational age of the preterm.

Key Words: bacteria, carbohydrates, human milk, immunocompounds, *myo*-inositol, preterm

(JPGN 2015;60: 120–126)

Breast-feeding is the natural and best advisable way of supporting the growth and development of healthy term infants (1). The benefits of breast milk are well recognized as providing health benefits in early infancy and extending into adulthood. In addition, the present research confirms that breast milk with appropriate fortification is the optimal care for the low- and the very-low-birth-weight infants (2). When breast-feeding may not be possible and own mother's milk may not be available, donor human milk becomes the next alternative (3,4).

The benefits of breast milk for preterm infants include faster gastric emptying (5); a faster tolerance to enteral feeding and a reduced need of parental nutrition (6); enhanced nutrient absorption (7); improved visual and cognitive development (8,9); and reduced incidence of necrotizing enterocolitis, sepsis, and other infections (10,11). Such effects are probably because of the combined action of nutrients and a variety of bioactive factors present in colostrum and breast milk, such as immunoglobulins, immunocompetent cells, antimicrobial fatty acids, polyamines, oligosaccharides, lysozyme, lactoferrin, and other glycoproteins, antimicrobial peptides and, also, commensal or probiotic bacteria (12,13).

It is long known that the concentration of many, if not all, nutrients and bioactive compounds changes from colostrum to mature milk and, in addition, there is a variability associated to several factors, such as host's genetic background, health status, nutrition, lactation stage (infant's age), "circadian" rhythm, milk fraction (foremilk, hindmilk), geographic location, and the like (12).

Gestational age may also influence the concentration of nutrients and bioactive compounds (14–16). Biochemical and immunological data suggest that mothers' colostrum or milk feedings may provide the greatest protection from infection for the most immature infants (17) which, in comparison with larger preterm infants, are the most immunocompromised, are exposed routinely to invasive, life-saving procedures and remain in the pathogen-laden neonatal intensive care unit for the longest period. Studies on the composition of colostrum and milk from mothers delivering before the 30th week of gestation are, however, scarce.

In this context, the objective of this work was to study a wide variety of microbiological, biochemical, and immunological parameters in milk of mothers of extremely preterm infants (<27th week of gestation), and to evaluate differences between colostrum and mature milk from these mothers.

Received April 25, 2014; accepted September 2, 2014.

From the *Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, the [†]Probisearch, Tres Cantos, the [‡]Departamento de Bioactividad y Análisis de Alimentos, Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, and the [§]Servicio de Neonatología, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain.

Address correspondence and reprint requests to Dr Irene Espinosa-Martos, Probisearch, C/ Santiago Grisolia, 2, 28760 Tres Cantos, Madrid, Spain (e-mail: irenee70@gmail.com).

This work was supported by the CYTED (IBERFUND 110AC0386), CSD2007-00063 (FUN-C-FOOD, Consolider-Ingenio 2010), and AGL2010-15420 projects from the Ministerio de Economía y Competitividad (Spain).

The authors report no conflicts of interest.

Copyright © 2014 by European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition

DOI: 10.1097/MPG.0000000000000560

METHODS

Colostrum and Mature Milk Samples

Colostrum samples ($n = 17$), expressed within 96 hours after delivery, and mature milk samples ($n = 34$), collected between days 14 and 56 after birth, were obtained from 22 mothers of extremely preterm infants who gave birth at the Hospital Universitario La Paz (Madrid, Spain) (Table 1). Sampling was performed following a specific protocol approved by the local ethical committee, and informed consent was obtained from each donor. To avoid differences between foremilk and hindmilk, an entire feed was manually expressed and, then, a representative aliquot (~ 2 mL) was stored at -20°C until analysis.

Bacterial Cultures and Identification of Isolates

Adequate peptone water dilutions of the samples were plated onto Man, Rogosa, and Sharpe (MRS; Oxoid, Basingstoke, UK) supplemented with L-cysteine (0.5 g/L) (MRS-C; a medium for isolation of lactic acid bacteria), TOS-Propionate (TOS; Merck, Whitehouse Station, NJ; a medium for isolation of bifidobacteria), MacConkey (MCK; BioMérieux, Marcy l'Etoile, France; a medium for isolation of enterobacteria), and Columbia Nalidixic Acid (CNA, BioMérieux; a highly nutritious, general-purpose medium for the isolation and cultivation of fastidious microorganisms) agar plates. MCK and CNA plates were aerobically incubated at 37°C for 24 hours, whereas MRS-C and TOS plates were incubated anaerobically (85% nitrogen, 10% hydrogen, and 5% carbon dioxide) in an anaerobic workstation (MINI-MACS; DW Scientific, Shipley, UK) at 37°C for 48 hours.

After incubation and counting, 1 representative of each colony morphology type was selected from each plate. These isolates were grown in brain heart infusion or MRS-C broth and stored at -80°C in the presence of glycerol (30%, v/v). All of the isolates were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight

(MALDI-TOF) mass spectrometry in a Vitek-MS Instrument (BioMérieux) in the facilities of ProbiSearch (Tres Cantos, Madrid, Spain). Briefly, a portion of a bacterial colony (~ 1 μL) was directly spotted onto a MALDI sample plate. Then, it was overlaid with 1 μL of a saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in acetonitrile (28%, v/v), and allowed to dry at room temperature. For each isolate, a mean spectrum was constructed with at least 50 m/z spectra profiles and used for the identification by comparison with the spectra contained in the Myla database (BioMérieux). Identification was defined as a 99% to 100% match to the species-specific m/z values in the database.

Analysis of Lactose, Glucose, and *myo*-Inositol

The concentrations of lactose, glucose, and *myo*-inositol were determined by gas chromatography with flame ionization detector in 17 colostrum and 34 mature milk samples following the method described by Montilla et al (18), with minor modifications. For this purpose, 0.2 mL of sample was made up to 2 mL with methanol in a volumetric flask to remove proteins and fat. Mixtures were gently stirred, followed by standing for at least 1 hour at room temperature until the supernatant became transparent. The clear supernatant was used for carbohydrate analysis and a solution of 0.04% (w/v) phenyl- β -D-glucoside in ethanol/water (70:30, v/v) was added as internal standard.

Before derivatization, equal volumes (0.5 mL) of supernatant and internal standard solution were mixed and dried at 38°C to 40°C in a rotary evaporator. For derivatization 100 μL of *N,N*-dimethylformamide was added to the dried mixtures and held at 70°C for 1 hour to obtain a constant anomeric composition. Then, 100 μL of *N*-trimethylsilylimidazole was added to silylate the carbohydrates, and the reaction was completed in 30 minutes at 70°C . Silylated carbohydrates were extracted with 0.1 mL of hexane and 0.2 mL of water. Volumes in the range of 1 to 2 μL of the organic phase containing silyl derivatives were injected into the column.

The trimethylsilyl ethers of carbohydrates were analyzed in an Agilent Technologies (Santa Clara, CA) 7890A gas chromatograph equipped with a commercial 30 m \times 0.32 mm inside diameter, 0.5 μm film fused silica capillary column SPB-17, bonded, cross-linked phase (50% diphenyl/50% dimethylsiloxane) (Supelco; Bellefonte, PA). Separation was performed at 235°C for 9 minutes, followed by an increase up to 270°C at rate of $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and maintenance of this temperature for 15 minutes. Temperatures of the injector and flame ionization detector were 280 and 290°C , respectively. Injections were carried out in split mode 1:30, using 1 mL/min of nitrogen as carrier gas. Data acquisition and integration were performed using Agilent Chem-Station Rev. B.03.01 software (Wilmington, DE). To study the response factor relative to the internal standard, solutions containing lactose, glucose, and *myo*-inositol were prepared over the expected concentration range in colostrum samples. The identity of carbohydrates present in colostrum samples was confirmed by comparison with relative retention times of standard samples. Quantitative analysis was carried out by the internal standard method. Response factors were calculated after triplicate analysis of standard solutions (glucose, *myo*-inositol, and lactose) at concentrations ranging from 1 to 6 g/L for lactose and from 1 to 50 mg/L for *myo*-inositol and glucose.

Immunological Analysis

The concentration of 18 cytokines, chemokines, and growth factors, including interleukin- 1_{β} (IL- 1_{β}), IL-6, IL-12(p70), interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IL-8, growth-related oncogene- α (GRO- α), macrophage-monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein- 1_{β} (MIP- 1_{β}), IL-5, IL-7, granulocyte

TABLE 1. Characteristics of study participants ($n = 22$)

Characteristic	No. (%)
Mother's age	
≤ 28	6 (27)
28–35	7 (32)
≥ 35	9 (41)
Gestational age, wk	
24	3 (14)
25	4 (18)
26	8 (36)
27	7 (32)
Type of delivery	
Vaginal	8 (36)
C-section	14 (64)
Singleton/twins	
Single	18 (82)
Twins	4 (18)
Use of antibiotics	
No	7 (32)
Yes	15 (68)
Use of corticosteroids	
No	6 (27)
One dose	5 (23)
Two doses	11 (50)
Chorioamnionitis	
No	14 (64)
Yes	8 (36)

colony-stimulating factor (G-CSF), and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), was determined in 15 colostrum and 11 milk samples using a Bioplex 200 system instrument (Bio-Rad, Hercules, CA) and the Bio-PlexPro Human Cytokine, Chemokine, and Growth Factor Assays (Bio-Rad). Previously, and to avoid interferences in the immunoassay, the fatty layer and the somatic cells were removed from the samples. Briefly, sample aliquots (1 mL) were centrifuged at 800g for 15 minutes at 4°C and the intermediate aqueous phase was collected and stored at -20°C until analysis. All the determinations were carried out by duplicate following the manufacturer's protocol, and standard curves were performed for each analyte.

The concentration of immunoglobulin (Ig) IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgM, and IgA was determined in the same samples using the Bio-PlexPro Human Isotyping Assay kit (Bio-Rad) in the Bioplex 200 system instrument. For this purpose, the samples were conditioned as described above for cytokine analysis. Analyses were carried out by duplicate following the manufacturer's protocol, and standard curves were performed for each analyte.

Statistical Analysis

Microbiological data, recorded as colony forming units (CFU) per milliliter, were transformed to logarithmic values before statistical analysis. Biochemical data (sugars and bioactive compounds) were tested for normality of distribution by Shapiro-Wilk tests. Normal data were expressed as the mean and 95% confidence interval (CI) of the mean, whereas not normal data were expressed as the median and interquartile range (IQR).

The contingency tables of the detection frequencies of bacterial species, cytokines, and immunoglobulins were obtained, and then differences were evaluated with the χ^2 test; when required the Yates correction was applied. Relations between epidemiological information were evaluated with the χ^2 test; when required the Yates correction was applied. Differences in mayor bacterial species counts, Shannon-Weaver diversity indexes, sugar concentrations, and immunocompounds in colostrum and mature milk were evaluated using 1-way analysis of variance when the variable was normally distributed, and the Kruskal-Wallis test when not. Differences were considered significant at $P < 0.05$. Statgraphics Centurion XVI version 16.1.15 (Statpoint Technologies Inc, Warrenton, VA) and R 2.15.3 (R Project, www.r-project.org) software were used to perform these analyses.

RESULTS

Study Participants

A total of 22 women participated in this study and provided 17 colostrum and 34 mature milk samples. The characteristics (age,

week of pregnancy, way of delivery, single/twins pregnancy, antibiotic and corticosteroid treatment, and chorioamnionitis) of study participants are presented in Table 1. All of them gave birth between weeks 24 and 27 (14% at week 24, 18% at week 25, 36% at week 26, and 32% at week 27). Some relations were observed when frequencies of these characteristics' categorical factors were cross-tabulated and an independency test was carried out (Table 2). Week of birth was related to mother's age ($P = 0.045$), those women being younger who delivered at the shortest gestational ages; similarly, a diagnosis of chorioamnionitis was more frequent as the gestational age was shorter ($P = 0.012$), and as the mother's age was lower ($P = 0.038$). Finally, antibiotic treatment was related with C-section deliveries ($P = 0.000$).

Bacterial Counts and Identification of the Isolates

Viability of bacteria using both general and selective growth media was evaluated in the 17 colostrum and 34 mature milk samples. Low detection frequencies were observed in both types of samples because bacteria could only be isolated from a relatively low percentage of them (Table 3). When bacterial growth was detected, the bacterial counts oscillated between 2.00 and 3.28 log₁₀ CFU/mL and between 2.00 and 4.19 log₁₀ CFU/mL in colostrum and mature milk samples, respectively (Table 3). The main genera isolated from colostrum were *Staphylococcus*, *Streptococcus*, and *Lactobacillus*, whereas, in addition to these genera, *Enterococcus* and enterobacteria were also among the main microorganisms isolated from mature milk (Table 3). The detection frequencies of enterococci ($P = 0.000$), lactobacilli ($P = 0.041$), and enterobacteria ($P = 0.038$) in mature milk samples were statistically higher than in the colostrum ones (Table 3). The mean for staphylococci counts was higher in colostrum, whereas those for streptococci and lactobacilli were higher in mature milk, although such differences did not reach a statistically significant level. In relation to the Shannon-Weaver diversity index, no significant differences were observed between the colostrum and the mature milk samples analyzed in this study.

Analysis of Lactose, Glucose, and myo-Inositol

The mean values and ranges of lactose, myo-inositol, and glucose concentrations found in the colostrum and mature milk samples are shown in Fig. 1. Mean (95% CI) concentration values of lactose were 56.90 (52.08–61.71) and 62.54 (60.37–64.71) g/L in the colostrum and the milk samples, respectively. myo-inositol and glucose were also detected and quantified; myo-inositol concentrations were 300.59 (249.70–351.48) and 194.27 (172.51–216.02)

TABLE 2. Relations among the characteristics of study participants (n = 22)

P*	Gestational age	Type of delivery	Antibiotic	Corticosteroids	Chorioamnionitis	Mother's age†
Gestational age		0.095	0.179	0.438	0.012	0.045
Type of delivery			0.000	0.181	0.326	0.513
Antibiotic				0.071	0.673	0.244
Corticosteroids					0.334	0.053
Chorioamnionitis						0.038
Mother's age†						

*The independence of those categorical factors was evaluated by χ^2 tests with Yates correction, when required.

†Mother's age was categorized into 3 levels according to data distribution: ≤ 25 percentile (≤ 28 years), between 25–75 percentiles (28–35 years) and ≥ 75 percentile (≥ 35 years).

TABLE 3. Counts (log [CFU/mL]) of major bacterial groups and SDI in the colostrum and mature milk samples analyzed in this study

	Colostrum, n = 17		Mature milk, n = 34		<i>P</i> [*]	<i>P</i> [†]
	n (%)	Median (IQR)	n (%)	Median (IQR)		
<i>Staphylococcus</i> spp	6 (35)	3.28 (2.54–4.12)	8 (23)	2.74 (2.36–3.05)	0.061	0.136
<i>Enterococcus</i> spp	0		10 (29)	2.81 (2.64–3.57)	0.000	
<i>Streptococcus</i> spp	3 (18)	2.00 (2.00–2.57)	4 (12)	3.11 (2.71–3.38)	0.235	0.271
<i>Lactobacillus</i> spp	2 (12)	2.79 (2.40–3.19)	8 (23)	4.19 (3.77–4.47)	0.041	0.068
Other Gram + bacteria	3 (18)	2.95 (2.93–2.98)	3 (9)	2.00 (2.00–2.80)	0.063	0.506
Enterobacteria	1 (6)	2.60	5 (15)	2.95 (2.00–2.95)	0.038	0.763
SDI	11 (65)	0.67 (0–0.89)	24 (70)	0 (0–0.78)	0.450	0.505

Results are expressed as median and IQR. IQR = interquartile range; SDI = Shannon-Weaver diversity index

* χ^2 test was used to evaluate differences in frequency of detection between colostrum and mature milk samples; when required the Yates correction was applied.

†Kruskal-Wallis test was used to compare between counts obtained in colostrum and mature milk samples.

mg/L in the colostrum and the mature milk samples, respectively, whereas those of glucose, expressed as median (IQR), were 109.29 (44.24–154.41) and 588.79 (152.80–845.11) mg/L, respectively.

Although the levels of these 3 compounds showed a certain degree of variability depending on the women, the mean concentrations of colostrum's lactose, *myo*-inositol, and glucose were statistically different from those found in the mature milk samples (Fig. 1); glucose ($P = 0.000$) and lactose ($P = 0.013$) concentrations were significantly higher in mature milk whereas that of *myo*-inositol ($P = 0.000$) was significantly higher in the colostrum ones.

Immunological Analysis

The concentrations of a variety of cytokines, chemokines, growth factors, and immunoglobulins in 15 colostrum and 11 mature milk (milk obtained ≥ 21 days after birth) samples were measured in this study (Table 4). Globally, the values obtained for all these immune factors showed a high degree of variability depending on the donor, a fact that is reflected in the CI or IQR values obtained for some of the analyzed parameters, such as

IgG₁, IgG₂, IgM, IgA, IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-17, IL-8, IL-7, and G-CSF.

All the immunoglobulins (with the exception of IgG₂ detected in 47% of the samples), together with IL-1 β , IL-6, IL-8, GRO- α , MCP-1, MIP-1 β , IL-7, and G-CSF, could be detected in all the colostrum samples. In contrast, GM-CSF (1 sample), IL-2 (3 samples), and IL-10 (5 samples) showed the lowest detection frequencies in these samples (Table 4).

In relation to mature milk, all the immunoglobulins were also detected in all the samples with the exception, again, of IgG₂, which could not be detected in any sample. IL-8, MCP-1, and MIP-1 β could also be detected in all the samples, whereas in the case of IL-1 β , IL-6, GRO- α , IL-7, and G-CSF, there was only a single sample in which these could not be detected (Table 4). In addition, IgG₂, IFN- γ , IL-2, IL-4, and IL-17 were not detected in any mature milk sample (Table 4).

The mean concentration of all the immune compounds in the colostrum samples was higher than that in the mature milk ones, with the exceptions of IL-13 and GRO- α (Table 4). Despite the high degree of variability depending on the donor, statistically significant differences between colostrum and mature milk samples were

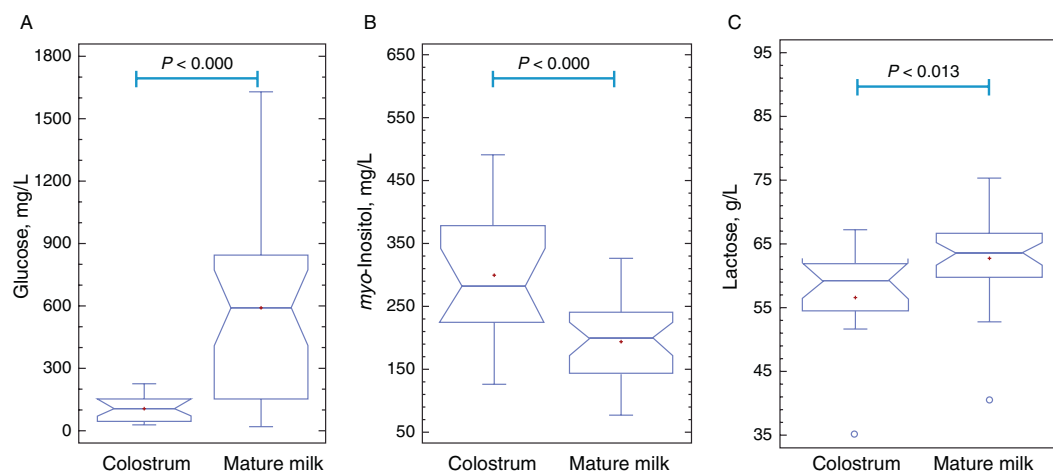


FIGURE 1. Concentration of glucose (A), *myo*-inositol (B), and lactose (C) in colostrum (n = 17) and mature milk (n = 34) samples from mothers of extremely preterm infants. Kruskal-Wallis test was used for glucose, for which values were not normally distributed whereas 1-way analysis of variance was used for *myo*-inositol and lactose.

TABLE 4. Concentration of the immunocompounds in the colostrum (n = 15) and mature milk (n = 11) samples analyzed in this study

	Colostrum		Mature milk		<i>P</i> [*]	<i>P</i> [†]
	Fr, %	Mean (95% CI)	Fr, %	Mean (95% CI)		
Immunoglobulins						
IgG ₁ , mg/L	100	87.80 (11.63–163.97)	100	10.36 (5.05–15.65)	1.000	0.076
IgG ₂ , mg/L	47	68.04 (–2.92 to 139.00)	0	—	0.045	0.229
IgG ₃ , mg/L	100	2.82 (0.98–4.65)	100	0.24 (0.11–0.37)	1.000	0.017
IgG ₄ , mg/L	100	0.98 (0.45–1.52)	100	0.29 (0.12–0.46)	1.000	0.031
IgM, g/L	100	0.78 (–0.20 to 1.77)	100	21.55 (0.87–42.22)	1.000	0.168
IgA, g/L	100	8.98 (0.56–17.40)	100	0.68 (–0.63 to 3.99)	1.000	0.133
Innate immunity						
IL-1 β , ng/L	100	42.28 (–32.23 to 116.81)	91	0.37 (0.06–0.68)	1.000	0.338
IL-6, ng/L	100	73.97 (18.69–129.24)	91	3.27 (1.43–5.12)	1.000	0.036
IL-12 (p70), ng/L	80	6.33 (3.78–8.89)	18	0.16 (–1.62 to 1.94)	0.000	0.057
IFN- γ , ng/L	53	87.95 (18.04–157.85)	0	—	0.005	0.000
TNF- α , ng/L	80	36.86 (6.39–67.32)	64	3.11 (1.09–5.13)	0.012	0.083
Acquired immunity						
IL-2, ng/L	20	2.42 (–1.48 to 6.32)	0	—	0.238	1.000
IL-4, ng/L	67	4.24 (2.43–6.05)	0	—	0.000	0.000
IL-10, ng/L	33	1.31 (–0.13 to 2.75)	27	0.89 (–0.54 to 2.31)	0.354	0.582
IL-13, ng/L [‡]	60	0.80 (0.39–0.88)	82	32.32 (6.31–37.78)	0.001	0.000
IL-17, ng/L [‡]	67	126.03 (73.75–139.83)	0	—	0.000	0.000
Chemokines						
IL-8, μ g/L	100	15.48 (–6.84 to 37.80)	100	0.04 (0.02–0.06)	1.000	0.218
GRO- α , μ g/L	100	11.50 (5.56–17.44)	91	16.41 (2.39–30.43)	0.856	0.426
MCP-1, μ g/L	100	7.25 (3.03–11.47)	100	0.36 (0.15–0.57)	1.000	0.006
MIP-1 β , μ g/L [‡]	100	0.86 (0.25–1.23)	100	0.05 (0.03–0.09)	1.000	0.000
Hematopoietic stimuli						
IL-5, ng/L	80	1.38 (0.59–2.17)	9	0.24	0.003	0.398
IL-7, ng/L	100	142.64 (–4.38 to 289.67)	91	63.55 (25.57–101.52)	0.856	0.365
G-CSF, ng/L	100	107.53 (12.22–202.84)	91	21.90 (5.72–38.07)	0.856	0.134
GM-CSF, ng/L	7	84.15	36	51.84 (–12.93 to 116.60)	0.001	0.529

CI = confidence interval; Fr = relative frequency of detection; G-CSF = granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF = granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GRO = growth-related oncogene; IL = interleukin; IFN = interferon; IQR = interquartile range; MCP = macrophage-monocyte chemoattractant protein; MIP = macrophage inflammatory protein; TNF = tumor necrosis factor. Levels of immunocompound were expressed as mean and 95% CI when data were normally distributed and as median and IQR when not.

* Fr differences between colostrum and mature milk samples were evaluated by χ^2 test, with Yates correction when required.

† One-way analysis of variance was used to determine the differences between colostrum and mature milk when data were normally distributed and Kruskal-Wallis test when they were not.

‡ Not normally distributed.

found for the concentrations of IgG₃ ($P = 0.017$), IgG₄ ($P = 0.031$), IL-6 ($P = 0.036$), IFN- γ ($P = 0.000$), IL-4 ($P = 0.000$), IL-13 ($P = 0.000$), IL-17 ($P = 0.000$), MCP-1 ($P = 0.006$), and MIP-1 β ($P = 0.000$) (Table 4). Statistically significant differences were also observed in relation to the detection frequencies of IgG₂ ($P = 0.045$), IL-12(p70) ($P = 0.000$), IFN- γ ($P = 0.005$), TNF- α ($P = 0.012$), IL-4 ($P = 0.000$), IL-13 ($P = 0.001$), IL-17 ($P = 0.000$), IL-5 ($P = 0.003$), and GM-CSF ($P = 0.001$), all of them being more frequently detected in colostrum than in mature milk samples, except for IL-13 whose detection frequency was higher in mature milk (Table 4).

DISCUSSION

Staphylococci, streptococci, and lactobacilli were the main bacterial groups isolated from colostrum and they could be also isolated, together with enterococci and enterobacteria, from some mature milk samples. In the last decade, breast milk has been recognized as a source of commensal and potential probiotic bacteria, including the bacterial groups cited above (13). The

bacterial concentration (2–4 log CFU/mL) was similar to the values previously reported from colostrum and milk of healthy women (19–21). In contrast, bacteria could be detected only in a relatively low percentage (<67%) of the colostrum and mature milk samples analyzed in this study, whereas previous studies have shown that milk of most (if not all) women contain detectable levels of viable bacteria (22–26). The low bacterial detection frequency observed among colostrum and mature milk of mothers of extremely preterm babies may be for 2 reasons. First, it has been pointed that a specific mammary microbiota is formed during late pregnancy through an enteromammary mechanism involving gut monocytes (27); this process, involving a physiological bacterial translocation from the gut to mesenteric lymph nodes and mammary gland, seems to be exacerbated in the last weeks before the term delivery (19). Therefore, bacterial colonization of the mammary glands of extreme preterms' mothers may be, at least, minimum, and it may account for the lower detection frequency found in this study. Some culture-dependent and -independent studies have confirmed a vertical mother-to-infant bacterial transfer of maternal gut bacteria via breast milk (28–31). In addition, 2 studies that focused on the oral

administration of 3 lactobacilli strains isolated from human milk provided new evidences that show the existence of a bacterial enteromammary pathway during lactation (32,33).

The second reason for a low bacterial detection frequency is the high percentage of women who received antibiotherapy among those who participated in this study. It has been reported that the number of lactobacilli- or bifidobacteria-positive milk samples was significantly lower in women who had received antibiotherapy during pregnancy or lactation (26). It is well known that antibiotics are responsible for dysbiosis processes in the human microbiota, leading to antibiotic-associated diarrhea and gastroenteritis, genitourinary, and oral infections. In the last years, it is becoming evident that antibiotherapy during pregnancy, intrapartum, or lactation alters the maternal microbiota, a fact that may have negative consequences to infant health (34). The use of antibiotics during pregnancy is associated to an increased risk of infant asthma exacerbation and hospitalization, thereby supporting a role for bacterial ecology in pre- or perinatal life for the development of asthma (35).

A cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of the samples would have been an excellent complement to the culture-based analysis, particularly for the detection of strict anaerobe bacteria (25); however, the bacterial concentration of hygienically collected human milk samples is typically low ($<10^3$ CFU/mL) and, therefore, a relatively high quantity (5–10 mL) of sample is required to obtain a concentration of bacterial DNA suitable for pyrosequencing or other DNA-related analysis. In this case, only 2 mL of each sample was available because the rest of the colostrum/milk volume was used to feed the baby.

The transition from colostrum to mature breast milk during early puerperium is associated with significant concentration changes of numerous compounds, including concentrations of free sugars and polyols. It has been repeatedly observed that, after the first days of a term postpartum, the concentrations of lactose and glucose increase significantly (36–38). The results of this work showed that the glucose and lactose concentrations in the examined population had also a significant upward trend from colostrum to milk. Although previous studies reported that preterm milk generally has lower lactose levels than term milk (36,39), the colostrum and mature milk concentrations of lactose observed in this study were similar to those obtained with the same methodology in mothers of term neonates (21,40).

In contrast to lactose or glucose, the concentrations of *myo*-inositol decrease significantly during the first 4 days of lactation (38,40,41), a fact that has been observed in this study, too. *myo*-Inositol promotes maturation of several components of surfactant and may play a critical role in fetal and early neonatal life (42). In a pioneer study, Bromberger and Hallman (43) found striking differences in the *myo*-inositol concentration of infant feedings (preterm colostrum, term colostrums, mature milk, infant formulas, parenteral nutrition). More specifically, colostrum from mothers who delivered prematurely had the highest *myo*-inositol concentration, which was significantly higher than that in colostrum from mothers who delivered at term. *myo*-Inositol concentrations in colostrum were significantly higher than those in mature milk, whereas preterm and mature milk *myo*-inositol levels did not differ significantly from each other. The results obtained in our work confirm such findings since the *myo*-inositol concentration in colostrum samples (mean 300.59 mg/L) was significantly higher than that in the mature milk ones (mean 194.27 mg/L). In addition, the mean colostrum concentration found in this study (from samples provided by mothers of extreme preterms) was notably higher than that reported in a previous work (40) when colostrum samples from mothers of term babies were analyzed using the same procedure and

technology (mean 243.28 mg/L). The administration of inositol to premature infants with respiratory distress syndrome who are receiving parenteral nutrition during the first week of life is associated with increased survival without bronchopulmonary dysplasia and with a decreased incidence of retinopathy of prematurity (44,45). A Cochrane revision concluded that inositol supplementation results in statistically significant and clinically important reductions in important short-term adverse neonatal outcomes, and that a multicenter randomized controlled trial of appropriate size is justified to confirm such findings (42). Therefore, the results of this study highlight the importance of own's mother colostrum for preterm neonates.

In agreement with our findings, previous studies have reported that the amounts of several cytokines, chemokines, growth factors, and immunoglobulins, with anti-infectious, anti-inflammatory, and immunomodulatory roles, are notably higher in colostrum than in milk (46). The colostrum of mothers of extremely preterm infants analyzed in this study showed higher concentrations of relevant immunocompounds, such as IgA, IL-6, TNF- α , IL-4, IL-17, MCP-1, MIP-1 β , IL-5, IL-7, or G-CSF, than those observed in term colostrum samples using the same procedure (40). It has been previously reported that, globally, immunoprotection provided by colostrum and milk increases as the gestational age (and, as a consequence, the neonate maturity) decreases (14,15,47). Colostrum collected at such a low gestational age (24–27 weeks) may be considered as a “prepartum milk” from the first stage of lactogenesis. Therefore, its peculiar composition may be because the junctions between alveolar cells are leaky at such pregnancy stage, allowing fluids and solutes (including large proteins) to flow between the milk space and the interstitial fluid of the mammary gland. So, it is more likely that the specific composition of colostrum in this extremely low period of gestation is related more to the immaturity of the mammary gland than to a physiological adaptation to the different metabolic/immunological needs of the extremely premature infants. These immune components that are unique to preterm colostrum may be especially protective during the first week of life and, particularly, to extremely preterm infants, a population at the highest risk for feeding intolerance and nosocomial infection (48,49). Therefore, it should be strongly recommended to start, as soon as possible, trophic feeds using own mother colostrum in extremely preterm infants because it is an easy and inexpensive procedure and well tolerated by even the smallest and sickest extremely preterm infants (50).

Analyses of correlations between all the parameters tested in this study were carried out but no statistically significant relations could be identified. Having in account the high number of factors that may affect the analyzed parameters, it is possible that a higher number of samples are required to observe significant relations among some of them.

In conclusion, a better knowledge on the composition of preterm colostrum and milk will help neonatologists and human milk banks to improve and optimize existing feeding strategies and to design novel alternatives.

REFERENCES

1. Agostoni C, Braegger C, Decsi T, et al. Breast-feeding: a commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009;49:112–25.
2. Lee HC, Kurtin PS, Wight NE, et al. A quality improvement project to increase breast milk use in very low birth weight infants. *Pediatrics* 2012;130:e1679–87.
3. American Academy of Pediatrics. Section on breastfeeding. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 2012;129:e827–41.
4. Arslanoglu S, Corpeleijn W, Moro G, et al., ESPGHAN Committee on Nutrition. Donor human milk for preterm infants: current evidence and research directions. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013;57:535–42.

5. Ewer AK, Yu VY. Gastric emptying in pre-term infants: the effect of breast milk fortifier. *Acta Paediatr* 1996;85:1112–5.
6. Schanler RJ. Overview: the clinical perspective. *J Nutr* 2000;130:417–9.
7. Hamosh M. Digestion in the premature infant: the effects of human milk. *Semin Perinatol* 1994;18:485–94.
8. Hart S, Boylan LM, Carroll S, et al. Brief report: breast-fed one-week-olds demonstrate superior neurobehavioral organization. *J Pediatr Psychol* 2003;28:529–34.
9. Di Biasie A. Evidence-based review of retinopathy of prematurity prevention in VLBW and ELBW infants. *Neonat Netw* 2006;25:393–403.
10. Lucas A, Cole TJ. Breast milk and neonatal necrotizing enterocolitis. *Lancet* 1990;336:1519–23.
11. Rønnestad A, Abrahamsen TG, Medbø S, et al. Late-onset septicemia in a Norwegian national cohort of extremely premature infants receiving very early full human milk feeding. *Pediatrics* 2005;115:e269–76.
12. Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am* 2013;60:49–74.
13. Fernández L, Langa S, Martín V, et al. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res* 2013;69:1–10.
14. Montagne P, Cuillière ML, Mole C, et al. Immunological and nutritional composition of human milk in relation to prematurity and mother's parity during the first 2 weeks of lactation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;29:75–80.
15. Koenig A, de Albuquerque Diniz EM, Barbosa SF, et al. Immunologic factors in human milk: the effects of gestational age and pasteurization. *J Hum Lact* 2005;21:439–43.
16. Moltó-Puigmartí C, Castellote AI, Carbonell-Estrany X, et al. Differences in fat content and fatty acid proportions among colostrum, transitional, and mature milk from women delivering very preterm, preterm, and term infants. *Clin Nutr* 2011;30:116–23.
17. Rodríguez NA, Meier PP, Groer MW, et al. Oropharyngeal administration of colostrum to extremely low birth weight infants: theoretical perspectives. *J Perinatol* 2009;29:1–7.
18. Montilla A, Moreno FJ, Olano A. A reliable gas capillary chromatographic determination of lactulose in dairy samples. *Chromatographia* 2005;62:311–4.
19. Perez PF, Doré J, Leclerc M, et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics* 2007;119:e724–32.
20. Jiménez E, Fernández L, Delgado S, et al. Assessment of the bacterial diversity of human colostrum by cultural-based techniques. Analysis of the staphylococcal and enterococcal populations. *Res Microbiol* 2008;159:595–601.
21. Gómez de Segura A, Escuder D, Montilla A, et al. Heating-induced bacteriological and biochemical modifications in human donor milk after holder pasteurisation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;54:197–203.
22. Heikkilä MP, Saris PEJ. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol* 2003;95:471–8.
23. Martín R, Langa S, Reviriego C, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* 2003;143:754–8.
24. Marín ML, Arroyo R, Jimenez E, et al. Cold storage of human milk: effect on its bacterial composition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009;49:343–8.
25. Jost T, Lacroix C, Braegger C, et al. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *Br J Nutr* 2013;110:1253–62.
26. Soto A, Martín V, Jiménez E, et al. Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014;59:78–88.
27. Jeurink PV, van Bergenhenegouwen J, Jiménez E, et al. Human milk: a source of more life than we imagine. *Benef Microbes* 2013;4:17–30.
28. Albesharat R, Ehrmann MA, Korakli M, et al. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Syst Appl Microbiol* 2011;34:148–55.
29. Makino H, Kushiro A, Ishikawa E, et al. Transmission of intestinal *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains from mother to infant, determined by multilocus sequencing typing and amplified fragment length polymorphism. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:6788–93.
30. Martín V, Maldonado A, Moles L, et al. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *J Human Lact* 2012;28:36–44.
31. Jost T, Lacroix C, Braegger CP, et al. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breast-feeding. *Environ Microbiol* 2014;16:2891–904.
32. Jiménez E, Fernández L, Maldonado A, et al. Oral administration of lactobacilli strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:4650–5.
33. Arroyo R, Martín V, Maldonado A, et al. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of lactobacilli isolated from breast milk. *Clin Infect Dis* 2010;50:1551–8.
34. Murk W, Risnes KR, Bracken MB. Prenatal or early-life exposure to antibiotics and risk of childhood asthma: a systematic review. *Pediatrics* 2011;127:1125–38.
35. Stensballe LG, Simonsen J, Jensen SM, et al. Use of antibiotics during pregnancy increases the risk of asthma in early childhood. *J Pediatr* 2013;162:832–8.
36. Cavalli C, Teng C, Battaglia FC, et al. Free sugar and sugar alcohol concentrations in human breast milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;42:215–21.
37. Gabrielli O, Zampini L, Galeazzi T, et al. Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. *Pediatrics* 2011;128:e1520–31.
38. Jóźwik M, Jóźwik M, Teng C, et al. Human breast milk sugars and polyols over the first 10 puerperium days. *Am J Hum Biol* 2013;25:198–204.
39. Coppa GV, Pierani P, Zampini L, et al. Lactose, oligosaccharide and monosaccharide content of milk from mothers delivering preterm newborns over the first month of lactation. *Minerva Pediatr* 1997;49:471–5.
40. Espinosa-Martos I, Montilla A, Gómez de Segura A, et al. Bacteriological, biochemical, and immunological modifications in human colostrum after Holder pasteurisation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013;56:560–8.
41. Pereira GR, Baker L, Egler J, et al. Serum myoinositol concentrations in premature infants fed human milk, formula for infants, and parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr* 1990;5:S89–93.
42. Howlett A, Ohlsson A, Plakkal N. Inositol for respiratory distress syndrome in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* (3)2012CD000366.
43. Bromberger P, Hallman M. Myoinositol in small preterm infants: relationship between intake and serum concentration. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1986;5:455–8.
44. Hallman M, Järvenpää AL, Pohjavuori M. Respiratory distress syndrome and inositol supplementation in preterm infants. *Arch Dis Child* 1986;61:1076–83.
45. Hallman M, Bry K, Hoppu K, et al. Inositol supplementation in premature infants with respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1992;326:1233–9.
46. Garofalo R. Cytokines in human milk. *J Pediatr* 2010;156(2 Suppl):S36–40.
47. Castellote C, Casillas R, Ramírez-Santana C, et al. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *J Nutr* 2011;141:1181–7.
48. Westerbeek E, van den Berg A, Lafeber HN, et al. The intestinal bacterial colonization in preterm infants: a review of the literature. *Clin Nutr* 2006;25:361–8.
49. Thompson AM, Bizzarro MJ. Necrotizing enterocolitis in newborns: pathogenesis, prevention and management. *Drugs* 2008;68:1227–38.
50. Rodríguez NA, Meier PP, Groer MW, et al. A pilot study to determine the safety and feasibility of oropharyngeal administration of own mother's colostrum to extremely low-birth-weight infants. *Adv Neonatal Care* 2010;10:206–12.

*VIII. Administración de Bifidobacterium breve PS12929 y
Lactobacillus salivarius PS12934, dos cepas aisladas de
leche humana, a prematuros de muy bajo y extremadamente
bajo peso al nacer: estudio piloto*



*VIII. Administration of Bifidobacterium breve PS12929
and Lactobacillus salivarius PS12934, two strains isolated
from human milk, to very low and extremely low birth
weight preterm infants: a pilot study*

*Artículo Publicado en
"Journal of Immunology Research"*

Research Article

Administration of *Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934, Two Strains Isolated from Human Milk, to Very Low and Extremely Low Birth Weight Preterm Infants: A Pilot Study

Laura Moles,¹ Esperanza Escribano,² Javier de Andrés,^{1,3}
María Teresa Montes,² Juan M. Rodríguez,^{1,3} Esther Jiménez,³
Miguel Sáenz de Pipaón,² and Irene Espinosa-Martos³

¹Departamento Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

²Servicio de Neonatología, Hospital Universitario La Paz, 28046 Madrid, Spain

³Probisearch, Tres Cantos, 28760 Madrid, Spain

Correspondence should be addressed to Irene Espinosa-Martos; irene.espinosa@probisearch.com

Received 18 July 2014; Revised 8 September 2014; Accepted 16 September 2014

Academic Editor: Miguel Gueimonde

Copyright © 2015 Laura Moles et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The preterm infant gut has been described as immature and colonized by an aberrant microbiota. Therefore, the use of probiotics is an attractive practice in hospitals to try to reduce morbidity and mortality in this population. The objective of this pilot study was to elucidate if administration of two probiotic strains isolated from human milk to preterm infants led to their presence in feces. In addition, the evolution of a wide spectrum of immunological compounds, including the inflammatory biomarker calprotectin, in both blood and fecal samples was also assessed. For this purpose, five preterm infants received two daily doses ($\sim 10^9$ CFU) of a 1:1 mixture of *Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934. Bacterial growth was detected by culture-dependent techniques in all the fecal samples. The phylum *Firmicutes* dominated in nearly all fecal samples while *L. salivarius* PS12934 was detected in all the infants at numerous sample collection points and *B. breve* PS12929 appeared in five fecal samples. Finally, a noticeable decrease in the fecal calprotectin levels was observed along time.

1. Introduction

The gut microbiota of preterm infants is usually described as aberrant when compared to that of healthy term infants. Very often, the former is characterized by a notably lower bacterial diversity, a lower presence of bifidobacteria, and a higher concentration of potentially pathogenic bacteria [1–7]. This may have short-, medium-, and long-term health consequences since early colonizing organisms interact with the intestinal mucosa to shape the developing immune system [8, 9].

In fact, interactions with different components of the microbiota are crucial to the establishment and development

of T-cell subsets, including NK, Treg, and Th17 cells, in the appropriate proportions to achieve homeostasis [10].

Many preterm infants lack an important part of transplacental transfer of maternal antibodies since this process occurs mainly in the last third of pregnancy; in addition, they have an impaired pattern-recognition receptor function and a reduced leukocyte endothelial adhesion and extracellular bacterial elimination [11]. Together, these alterations in the microbial colonization pattern and in the maturation of immune system, together with their stay in a hospital environment and other factors, predispose preterm infants to infections and/or to diseases such as necrotizing enterocolitis (NEC) [12–15].

The administration of probiotics to preterm neonates often leads to a decrease in the morbidity and mortality rates, in those of NEC and, in some cases, even in those of sepsis [16–22]. Additional benefits associated with probiotic supplementation in preterm neonates include earlier achievement of full enteral feeding [22], a lower colonization by *Enterobacteriaceae* [23], and a better neurological and immunological evolution [22, 24]. For these reasons, the number of institutions including probiotic supplementation in routine preterm care is increasing rapidly although the safety of probiotics in very low and extremely low birth weight infants is still a matter of debate [25], the mechanisms backing such effects are not well known yet [10], and global conclusions are difficult to establish because different studies usually make use of different probiotic strains, dosages, and/or treatment period.

Human milk is acknowledged as the best feeding option to preterm infants [26, 27] because its use decreases the incidence of many negative outcomes of prematurity, such as late onset sepsis or NEC [28–30]. In addition, human milk seems to be an important source of potentially beneficial bacteria to the infant gut and some strains may find future applications as probiotics for preterm infants [31–36]. In this context, the objective of this exploratory study was to assess early gut colonization in a short cohort of preterm neonates receiving a combination of two probiotic strains isolated from human milk. Furthermore, a wide variety of blood and fecal immunological parameters were assessed in order to elucidate their utility in future studies involving a larger cohort.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design and Sampling. Five preterm infants were enrolled in this study within 2 days after their birth. All of them met the following inclusion criteria: birth weight < 1,300 g, gestational age at birth < 29 weeks, and absence of any malformation or metabolic disease at birth. The most relevant demographic and clinical variables from mother-infant pairs were compiled by the Medical Staff of the Service of Neonatology of the Hospital Universitario La Paz (Madrid, Spain). The Ethical Committee on Clinical Research of the Hospital Universitario La Paz of Madrid approved all study protocols (code number: 3551). Samples and clinical information were obtained after written informed consent by the infants' parents. This trial is registered with ClinicalTrials.gov identifier NCT02192996.

After spontaneous meconium expulsion (between the second and the fourth days of life), a mixture of *Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934, containing $\sim 1 \times 10^9$ colony-forming units (CFU) of each strain, was suspended in a sterile saline solution and administered twice a day to the infants through an enteral feeding system. Meconium samples were collected prior to probiotic administration and, later, fecal ($n = 14$) and blood ($n = 10$) samples were collected weekly for up to 28 days. Fecal samples were aliquoted and stored at -80°C or -20°C until microbiological or immunological analysis, respectively.

Blood samples were collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes; subsequently, the plasma was obtained within 4 h after extraction and stored at -20°C until analysis.

2.2. Microbiological Analysis. Adequate dilutions of five meconium and fourteen stool samples were spread onto Kanamycin Aesculin Azide Agar (KAA; Oxoid) for *Enterococcus* species isolation; de Man, Rogosa and Sharpe (MRS; Oxoid, Basingstoke, UK) supplemented with L-cysteine (0.5 g/L) (Sigma, St. Louis, USA) (MRScys) for isolation of lactic acid bacteria; MacConkey (MCK; BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) for isolation of *Enterobacteriaceae*; Sabouraud Dextrose Chloramphenicol (SDC, BioMérieux) for isolation of yeasts; TOS-Propionate (TOS; Merck, NJ, USA) for isolation of bifidobacteria; and Columbia Nalidixic Acid Agar (CNA, BioMérieux) as a general medium for isolation of other bacterial groups. Plates were aerobically incubated at 37°C for up to 48 h, with the exception of MRScys and TOS plates that were anaerobically incubated (85% nitrogen, 10% hydrogen, and 5% carbon dioxide) in an anaerobic workstation (Mini-MACS Don Whitley Scientific Limited, Shipley, UK) at 37°C for 48 h. Bacterial counts were recorded as the CFU/g of meconium or feces and transformed to \log_{10} values before statistical analysis.

At least one representative of each different colony type obtained from each sample was isolated. Approximately 140 isolates were analyzed by optical microscopy and identified by MALDI-TOF mass spectrometry in a Vitek-MS instrument (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) in the facilities of Probisearch S. L. (Tres Cantos, Spain).

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) genotyping of all the isolates identified as *L. salivarius* or *B. breve* was carried following a protocol previously described [37]. The profiles were compared to those of *L. salivarius* PS12934 and *B. breve* PS12929, respectively.

2.3. Immunological Analysis. The concentration of 18 cytokines, chemokines, and growth factors, including interleukin (IL) IL-1 β , IL-6, IL-12 (p70), interferon- γ (INF- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IL-8, growth related oncogene- α (GRO- α), macrophage-monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1 β (MIP-1 β), IL-5, IL-7, granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), was determined in 5 meconium, 14 feces, and 10 plasma samples by using a Bio-Plex 200 system instrument (Bio-Rad, Hercules, CA) and the Bio-Plex Pro Human Cytokine, Chemokine and Growth Factor Assays (Bio-Rad). Parallel, the concentration of immunoglobulin (Ig) IgG $_1$, IgG $_2$, IgG $_3$, IgG $_4$, IgM, and IgA was determined using the Bio-Plex Pro Human Isotyping Assay Kit (Bio-Rad).

Before analysis, 0.1 g of meconium and fecal samples was diluted in 0.9 mL of peptone water, homogenized, and centrifuged for 15 min at $14,000 \times g$ at 4°C ; then, supernatants ($\geq 200 \mu\text{L}$) were collected. Plasma samples were defrosted and properly diluted immediately before the immunological assay. Analyses were carried out in duplicate following the

manufacturer's protocol and standard curves were performed for each analyte. Lower limit of quantification (LLOQ) was different for each one of the parameters, ranging from 0.02 to 11.74 ng/L for cytokines and from 0.01 to 2 ng/L for immunoglobulins.

Additionally, calprotectin levels (LLOQ: 8 ng/L) were determined in 5 meconium, 14 feces, and 8 plasma samples using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Calpro, Lysaker, Norway) according to the manufacturer's instructions. The standard curve of calprotectin was obtained from triplicates of each assayed concentration and fit to a 4-parameter curve model.

2.4. Statistical Analysis. The statistical analysis was performed using R 2.15.3 (R-project, <http://www.r-project.org>). When data were not normally distributed, medians and interquartile ranges (Q1 and Q3) were calculated for all sampling times, and means and 95% confidence interval (95% CI) were used for normally distributed data. The richness and diversity of meconium and fecal microbiota were determined by calculating the Shannon-Weaver diversity index, which takes into account the number and evenness of the bacterial species. The Kruskal-Wallis test for nonnormal data or one-way ANOVA test, when data were normally distributed, was used to evaluate the differences between sampling times, in all measured variables, in plasma samples and for the comparison of immunological variables between plasma and fecal samples. The nonparametric Friedman test or one-way ANOVA test, when data were normally distributed, was used in fecal samples to evaluate the differences between sampling times in all measured variables. In all cases, *P* values of <0.05 were considered to be significant. Redundancy analysis (RDA) was used for exploration of whole data sets and evaluation of the possible relationship between gut colonization and immunological parameters with the clinical status of the participants. Finally, heatmaps of plasma and fecal samples were plotted. To do this, calculation of Kendall's correlation coefficients was performed and Ward agglomeration methods were used to obtain the clustering of the variables and cases matrix.

3. Results

3.1. Demographic and Clinical Characteristics of the Participants. The clinical and demographic data of the mothers and infants who participate in this study are summarized in Table 1. Although five preterm infants were included in this study, there were 2 sets of twins (infants 1 and 2; infants 3 and 4) and, therefore, data were collected from three mothers (Table 1).

All the infants were female and were born by Cesarean section with a mean gestational age of 28 weeks and 2 days. The mean birth weight was 1,020.4 g and the mean height and head circumference were 34.5 cm and 25.0 cm, respectively. These parameters showed *Z*-scores < 0. Infants stayed in the NICU a mean time of 30.6 days with a mean age at discharge of 65.4 days, which represented a mean corrected gestational age of 37 weeks and 5 days (Table 1).

Additional information of clinical features is provided as supplemental information (Supplemental Information 1; see Table S1 of the Supplementary Material available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2015/538171>).

3.2. Microbiological Analysis. Bacterial growth was detected in one meconium sample and in all the fecal samples. Differences in the bacterial counts of fecal samples were evaluated by nonparametric Friedman test on days 7, 14, 21, and 28 (data not shown).

Globally, the phylum *Firmicutes* predominated in all the fecal samples except in those belonging to infant 5 where *Proteobacteria* was present in a similar proportion (Figure 1(a)). On the other hand, *Proteobacteria* dominated at the 14th day of intervention in fecal samples of the siblings 3 and 4. The phylum *Actinobacteria*, mainly represented by the genus *Bifidobacterium*, was isolated from day 7 although not in all the fecal samples (Figure 1(a)).

Among the *Firmicutes*, the genera *Enterococcus* and *Lactobacillus* were isolated from all the fecal samples except in that of infant 2 at day 21 where *Lactobacillus* could not be detected. The bacterial counts of *Enterococcus* decreased significantly from day 7 to day 21 of treatment (*P* = 0.043) from 10.00 to 8.30 log CFU/g. In contrast, *Lactobacillus* counts increased from 6.60 log CFU/g after 7 days of probiotic treatment to 8.32 log CFU/g at the end of the intervention; in this case, the differences were not statistically significant due to both the individual variability and the small cohort. The genus *Staphylococcus* was mainly isolated in the first weeks of the study from meconium and 7-day fecal samples (Figure 1(b)) with median counts of 4.30 and 9.44 log CFU/g, respectively.

In relation to *Proteobacteria*, the genus *Enterobacter* was isolated from all the fecal samples except from two from infant 2 (days 7 and 21) and from one of infant 3 at day 28 (Figure 1(b)). Similarly, the genus *Klebsiella* was isolated from all fecal samples except from two collected at day 7 (siblings 3 and 4) and one at day 21 (infant 2). Bacterial counts of these two genera were significantly different at every sampling day (*P* = 0.007 and 0.046 for *Enterobacter* and *Klebsiella*, resp.) and a decrease was observed in *Klebsiella* median counts (from 10.19 log CFU/g at day 7 to 8.48 log CFU/g at day 28).

Finally, the *Bifidobacterium* median counts oscillated between 7.98 and 9.98 log CFU/g in the 6 fecal samples where this genus was detected (Figure 1(b)).

The SDI of the fecal samples fluctuated during the study probably due to the different antibiotic treatments that the infants received (Figure 1(c)).

In order to detect the presence of *L. salivarius* PS12934 and *B. breve* PS12929 in fecal samples, all the fecal isolates belonging to such species were PFGE genotyped. This technique revealed that *L. salivarius* PS12934 was present in all the infants at numerous sampling points while *B. breve* PS12929 could be detected after day 14.

The heatmap obtained from the fecal samples at different sampling times of all the infants is shown in Figure S1. The dendrogram resulted after Kendall correlation coefficient calculation highlights the similar species profile of fecal

TABLE 1: Epidemiological and clinical relevant data from the mother-infant pairs of this study.

Mothers	1	2	3		
Age (years)	30	18	28		
Fever	No	Yes	No		
Leukocytosis (>15,000 leukocytes/ μ L)	No	Yes	Yes		
C-reactive protein (mg/L)	26	7.6	40		
Antenatal antibiotics treatment	Yes	Yes	Yes		
Antenatal corticosteroids treatment	Complete	Uncomplete	Complete		
Chorioamnionitis	No	Yes	Yes		
Type of delivery	C-section	C-section	C-section		
Multiple delivery	Yes	Yes	No		
Infants	1	2	3	4	5
Rupture of fetal membranes (h)	672	0	0	0	432
Twin position	1	2	2	1	1
Sex	F	F	F	F	F
Gestational age (wk)	28 + 5	28 + 5	28 + 6	28 + 6	27 + 2
Birth weight (g) (Z-score)	1070 (−0.71)	980 (1.01)	1082 (−0.66)	1200 (−0.26)	770 (−1.02)
Birth height (cm) (Z-score)	36 (−1.3)	36 (−1.3)	36 (−1.3)	36 (−1.3)	32 (−1.8)
Birth head circumference (cm) (Z-score)	26 (−0.8)	26 (−0.8)	25.5 (−1.1)	26 (−0.8)	24 (−0.8)
Apgar score at 1 min	8	9	8	5	7
Apgar score at 5 min	9	9	9	7	8
Revival	Ventilation	No	Ventilation	Ventilation	Ventilation
PDA	Yes	No	Yes	Yes	No
Meconium spontaneous expulsion	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Meconium expulsion (h)	24	9	48	36	14
Probiotic starting age (d)	2	2	2	2	4
Probiotic treatment length (d)	18	18	31	19	25
NICU stay (d)	18	8	14	64	49
Age at discharge (d)	51	51	60	64	101
Corrected gestational age at discharge (wk)	36	36	37	38	42
Death	No	No	No	Yes	No

PDA: patent ductus arteriosus; NICU: neonatal intensive care unit.

Antenatal corticosteroid treatment was uncompleted or complete when mother received one or two doses of betamethasone, respectively, within one week and 24 h before delivery.

Apgar test ranged from 1 to 10: less than 5 means risk; up to 7 means normal.

Twin position means the position at birth, 1 being the infant who was nearest to the cervix.

samples of infant 2 at different sampling times and the almost identical species profile of fecal samples from days 7 and 14 of twins 3 and 4.

3.3. Immunological Analysis. A wide range of immune compounds were analyzed in plasma and fecal samples of the preterm infants throughout the study. An exploratory screening, using a principal component analysis (PCA) to detect outliers, revealed that the 7th day fecal sample from infant 4 was very different from the rest of the sample sets (data not shown). This infant was suffering a gastric bleeding at this sampling time and, therefore, this sample was excluded from the results of data sets.

Median values of the immune compounds concentrations in meconium and, also, in fecal samples at 7th and 14th days of probiotic supplementation are shown in Table 2. In general, the values obtained for all the immune factors showed a high

interindividual variability in both detection frequencies and amounts. The levels of some immune compounds changed throughout the study; those of IgG₂ and MCP-1 decreased progressively ($P = 0.074$ and $P = 0.076$, resp.) while that of IgA increased (>50 times) from meconium to fecal samples obtained at day 7 after birth ($P = 0.074$) (Table 2). However, only the inflammatory biomarker calprotectin decreased significantly along sampling time ($P = 0.041$).

Plasma concentrations of the immune compounds are shown in Table 3 and, as it can be observed, no significant changes were found. Globally, chemokines and proinflammatory compounds tended to decrease, with the exception of IL-12 and TNF- α . The levels of the latter and those of the anti-inflammatory compounds remained very constant along time. Plasma immunoglobulins also showed a high individual variability although all decreased, with the exception of IgG4 and IgM (Table 3).

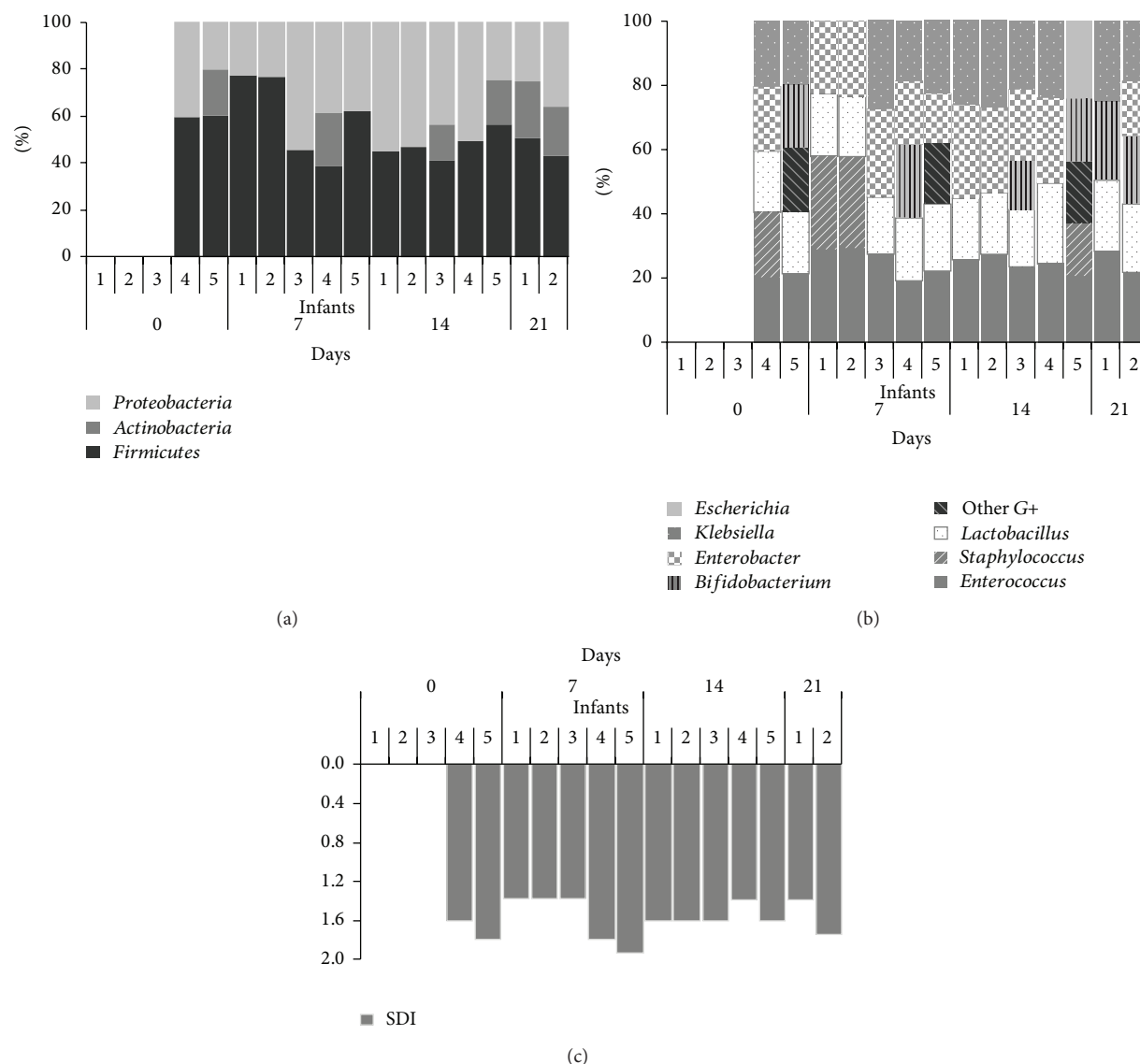


FIGURE 1: Phyla (a), genera (b), and bacterial diversity assessment by the SDI (c) of the microbiota of the meconium and fecal samples analyzed in this study. The relative contributions of the phyla and genera to the microbiota of the infant's gut and the SDI values were labeled per case and sampling time.

The plasma concentrations of the different immune compounds were compared with their respective fecal values. All the immunoglobulins, with the exception of IgA, were significantly different in both types of samples. Among the remaining immune parameters, calprotectin, IL-10, GRO- α , and GM-CSF were significantly higher in feces ($P = 0.000$, $P = 0.045$, $P = 0.048$, and $P = 0.000$, resp.) while IL-8, MCP-1, and MIP-1 β were more abundant in plasma ($P = 0.012$, $P = 0.000$, and $P = 0.001$, resp.) (Table S2).

3.4. Multivariate Analysis of the Studied Population. A multivariate analysis was performed for investigating the possible relationship between clinical features and the immunological and microbiological profiles of fecal and plasma samples.

The clinical variables considered were the following: antibiotherapy (Antibiotics); air way resume (AWResume) including ventilation, caffeine, and surfactant treatment; C-RP; hemoglobin amounts (Hb); hematocrit percentage (Hcte); ibuprofen treatment (Ibu.T); ibuprofen doses (Ibu.doses); number of stools per day (N°.stools); nutrition resuming the median feeding type (Nutrition); patent ductus arteriosus (PDA); Sepsis; spontaneous stools (Spont.stools); Transfusion; and Weight.

The redundancy analysis (RDA) of the above-mentioned variables for fecal samples is shown in Figure 2. The obtained model explains the 33% of the variability and the ANOVA test of the model was statistically significant ($P = 0.020$). The meconium samples were located opposite to microbial growth and in coincidence with the constrained antibiotic

TABLE 2: Frequency and concentration of immune compounds in fecal samples ($N = 14$) along time.

	Day 0 (<i>N</i> = 5)		Day 7 (<i>N</i> = 4)		Day 14 (<i>N</i> = 5)		<i>P</i> value*
	<i>n</i> (%)	Median (IQR) (mg/kg)	<i>n</i> (%)	Median (IQR) (mg/kg)	<i>n</i> (%)	Median (IQR) (mg/kg)	
Immunoglobulins							
IgG ₁	5 (100)	3.95 (1.23–6.36)	4 (100)	0.45 (0.23–0.80)	5 (100)	1.26 (0.47–2.43)	0.819
IgG ₂	5 (100)	23.82 (23.19–24.17)	4 (100)	2.98 (2.46–3.97)	5 (100)	2.66 (2.60–3.62)	0.074
IgG ₃	4 (80)	0.02 (0.01–0.02)	1 (25)	0.01 (0.01–0.01)	2 (40)	0.22 (0.11–0.32)	0.424
IgG ₄	5 (100)	0.03 (0.02–0.14)	4 (100)	0.02 (0.01–0.03)	5 (100)	0.03 (0.00–0.06)	0.449
IgM	4 (80)	2.72 (0.19–8.73)	3 (75)	1.10 (0.87–6.00)	5 (100)	2.79 (0.44–10.02)	0.819
IgA	5 (100)	3.57 (0.88–21.73)	4 (100)	201.23 (35.09–356.74)	5 (100)	7.49 (2.96–7.78)	0.074
		(ng/kg)		(ng/kg)		(ng/kg)	
Proinflammatory							
Calprotectin [†]	5 (100)	309.50 (282.00–343.90)	4 (100)	144.80 (132.30–180.40)	5 (100)	38.42 (34.16–63.96)	0.041
IL-1 _β [‡]	1 (20)	31.47	3 (75)	41.34 (8.00–74.68)	3 (60)	39.20 (–36.24–114.64)	0.937
IL-2	1 (20)	8.47	1 (25)	8.18	0 (0)	—	0.368
IL-6	0 (0)	—	0 (0)	—	1 (20)	27.44	0.368
IL-12 (p70)	2 (40)	29.07 (28.82–29.32)	2 (50)	37.13 (36.38–37.89)	1 (20)	82.98	0.926
IL-17	2 (40)	72.94 (62.76–83.11)	2 (50)	66.08 (64.46–67.71)	2 (40)	69.31 (65.15–73.48)	1.000
IFN-γ	4 (80)	214.90 (190.40–238.30)	4 (100)	299.80 (255.40–320.80)	4 (80)	248.10 (215.80–265.50)	0.449
TNF-α	1 (20)	20.87	0 (0)	—	0 (0)	—	0.368
		(ng/kg)		(ng/kg)		(ng/kg)	
Anti-inflammatory							
IL-4	3 (60)	2.74 (2.43–3.48)	4 (100)	2.63 (2.49–2.85)	3 (60)	2.12 (2.06–2.26)	0.268
IL-5	0 (0)	—	0 (0)	—	0 (0)	—	—
IL-10	1 (20)	25.62	2 (50)	37.21 (35.85–38.57)	3 (60)	39.20 (38.66–53.87)	0.319
IL-13	0 (0)	—	0 (0)	—	0 (0)	—	—
		(ng/kg)		(ng/kg)		(ng/kg)	
Chemokines							
IL-8	4 (80)	20.94 (19.00–23.82)	3 (75)	16.16 (15.56–17.20)	2 (40)	17.05 (16.45–17.64)	0.128
GRO-α [‡]	5 (100)	206.30 (117.04–295.57)	3 (75)	222.10 (–77.61–521.80)	4 (80)	263.50 (261.05–265.88)	0.763
MCP-1	5 (100)	20.08 (15.02–28.89)	2 (50)	18.37 (16.82–19.93)	3 (60)	16.98 (14.21–17.34)	0.076
MIP-1 _β	5 (100)	53.79 (52.03–68.66)	4 (100)	58.16 (46.46–66.42)	4 (80)	49.60 (35.16–69.89)	0.449
		(ng/kg)		(ng/kg)		(ng/kg)	
Haematopoietic stimuli							
IL-7	0 (0)	—	0 (0)	—	0 (0)	—	—
G-CSF	1 (20)	28.99	0 (0)	—	0 (0)	—	0.368
GM-CSF	5 (100)	1729.00 (1086.00–2312.00)	4 (100)	1830.00 (1648.00–2010.00)	4 (80)	1879.00 (1783.00–1920.00)	0.819

Levels of immune compounds were expressed as median and interquartile range (IQR) when data were not normally distributed and as mean and 95% confidence interval (95% CI) when they were. *Friedman test was used to determine the differences between fecal samples along time when data were not normally distributed and one-way ANOVA when they were. [†]Concentration was expressed as ng/Kg of feces for all the proinflammatory parameters with the exception of calprotectin whose units were mg/Kg. [‡]Normally distributed.

vector. Although the rest of fecal samples showed a less clear separation, the evolution of microbial colonization can be observed along the RDA1 axis in coincidence with the constrained vectors for AWResume, Nutrition, Spont.stools, PDA, and Transfusion and in opposite not only with the antibiotics and C-RP vectors, but also with the coordinates of proinflammatory compounds, such as calprotectin, MCP-1, MIP-1 β , TNF- α , and IL-8 (Figure 2).

The RDA of plasma samples (Figure 3) explains the 70% of the variability and the ANOVA test of the model was

statistically significant ($P = 0.010$). The bidimensional plot shows two points clearly separated from the others: infant 4 at day 19 and infant 5 at day 7. Three different situations were observed; on the one hand coordinates from infants 1, 2, and 3 did not change among sampling times, while on the other infant 5 showed a normalization far away of proinflammatory variables and hematological parameters coordinates; and finally infant 4 that initially was close to her corresponding twin and the rest of participants appeared at day 19, in the positive RDA1 and RDA2 coordinates, related to

TABLE 3: Frequency and concentration of immune compounds in plasma samples ($N = 8$) along time.

		Day 7 ($N = 3$)		Day 14 ($N = 5$)	
	n (%)	Median (IQR) (mg/L)	n (%)	Median (IQR) (mg/L)	P value*
Immunoglobulins					
IgG ₁	3 (100)	2159.80 (2075.95–2174.30)	5 (100)	1727.30 (1205.50–2029.60)	0.297
IgG ₂	3 (100)	1135.20 (796.03–1147.50)	5 (100)	741.24 (683.84–930.95)	0.456
IgG ₃	3 (100)	52.54 (46.75–64.53)	5 (100)	43.91 (41.35–48.14)	0.297
IgG ₄	3 (100)	23.25 (22.02–67.30)	5 (100)	44.66 (10.59–49.08)	0.655
IgM	3 (100)	263.75 (176.71–934.18)	5 (100)	335.18 (261.41–366.78)	0.882
IgA	3 (100)	27.03 (18.20–40.41)	5 (100)	4.44 (4.00–14.31)	0.101
		(ng/L)		(ng/L)	
Proinflammatory					
Calprotectin [†]	3 (100)	0.86 (0.47–1.11)	5 (100)	0.37 (0.37–0.63)	0.456
IL-1 _β [‡]	1 (33)	15.81	0 (0)	—	—
IL-2	2 (67)	35.41 (19.34–51.48)	3 (60)	9.70 (6.54–11.23)	1.000
IL-6	3 (100)	24.14 (15.99–65.65)	5 (100)	17.06 (10.10–19.24)	0.297
IL-12 (p70)	3 (100)	27.55 (19.89–91.22)	5 (100)	28.35 (22.71–29.16)	0.882
IL-17	1 (33)	167.20	2 (40)	35.66 (34.65–36.67)	0.221
IFN- γ	2 (67)	670.07 (371.30–968.83)	4 (80)	150.06 (67.73–225.91)	0.643
TNF- α	3 (100)	15.06 (11.35–66.01)	5 (100)	13.14 (11.83–20.40)	0.764
		(ng/L)		(ng/L)	
Anti-inflammatory					
IL-4	3 (100)	1.95 (1.57–7.96)	5 (100)	1.99 (1.69–2.90)	0.882
IL-5	1 (33)	39.43	1 (20)	9.65	0.317
IL-10	3 (100)	11.80 (11.10–69.56)	3 (60)	20.11 (16.02–22.68)	0.513
IL-13	1 (33)	11.27	1 (20)	5.06	0.317
		(ng/L)		(ng/L)	
Chemokines					
IL-8	3 (100)	31.69 (24.45–85.28)	5 (100)	29.76 (22.37–30.79)	0.655
GRO- α [‡]	2 (67)	204.44 (–1859.94–2268.82)	3 (60)	55.42 (45.11–65.73)	0.306
MCP-1	3 (100)	193.91 (123.14–204.59)	5 (100)	88.62 (60.77–192.54)	0.456
MIP-1 _β	3 (100)	234.90 (210.30–292.20)	5 (100)	174.60 (150.00–250.80)	0.297
		(ng/L)		(ng/L)	
Haematopoietic stimuli					
IL-7	2 (67)	28.14 (17.72–38.57)	3 (60)	10.48 (8.84–12.50)	0.564
G-CSF	3 (100)	30.89 (23.21–96.81)	5 (100)	47.27 (41.84–51.46)	0.655
GM-CSF	3 (100)	248.80 (191.00–299.30)	4 (80)	132.35 (114.97–151.83)	0.157

Levels of immune compounds were expressed as median and interquartile range (IQR) when data were not normally distributed and as mean and 95% confidence interval (95% CI) when they were. *Kruskal-Wallis test was used to determine the differences between blood samples along time when data were not normally distributed and one-way ANOVA test when they were. [†]Concentration was expressed as ng/L of plasma for all the proinflammatory parameters with the exception of calprotectin whose units were mg/L. [‡]Normally distributed.

constrained variables vectors corresponding to C-RP, Sepsis, and PDA reflecting the clinical worsening of this infant at this moment.

Those clinical categorical variables explained by the fecal and plasma RDAs were used, together with the microbiological, immunological, and clinical parameters, to create two heatmaps, one for each type of samples (Figure 4). The results from all the available fecal samples of the 5 infants were used to perform the heatmap showed in Figure 4(a). The samples' dendrogram shows two arms which clearly separate

meconium and feces. The variables' dendrogram, obtained after samples clustering, shows two principal arms. The lower one is divided into two: the first of them that included clinical variables, some bacterial genera such as *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Bifidobacterium*, and *Paenibacillus*, immunoglobulins IgG₃ and IgG₄, and cytokines IL-4, IL-13, and IL-2 and the second one that included antibiotherapy, IgG₁, IL-5, IL-6, and IL-7. The upper arm is also divided and included the rest of the bacterial genera and immunological parameters together with the weight of the infants. The results obtained for all the

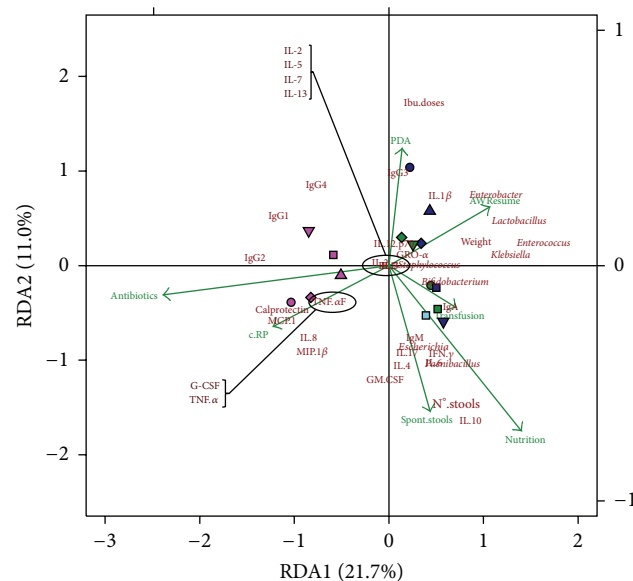


FIGURE 2: Redundancy analysis of the fecal samples obtained at different sampling times from the preterm infants. Cases were represented with points and then labeled per infant (1: circle, 2: square, 3: diamond, 4: triangle, and 5: inverted triangle) and sampling time (0: medium violet red, 7: green, 14: midnight blue, and 21: sky blue) Quantitative variables matrix, including the hematological and immunological parameters, ibuprofen doses (Ibu.doses), number of stools per day (N°.stools), and weight, was represented with each variable name or abbreviator in dark red color; clinical categorized observations vectors matrixes were used as constrained variables (airway resume (AWResume), antibiotherapy (Antibiotics), C-RP, ibuprofen treatment (Ibu treatment), nutrition type (Nutrition), patent ductus arteriosus (PDA), Sepsis, spontaneous stools (Spont.stools), and Transfusion) and represented as vectors in green color. The bidimensional RDA plot explains the 33% of the variability and showed a *P* value of 0.020 after 299 permutations when ANOVA test of the model was performed.

available plasma samples from the 5 participants were used to perform the heatmap showed in Figure 4(b). The plasma samples' dendrogram shows two groups, in one of them 2 samples of the infant 2 cluster together with her twin at day 14 and samples of infant 5 clusters together with sample of infant 1 at day 7. In the second arm, siblings 3 and 4 at day 14 of probiotic supplementation initiate the clustering, which ends with sample of day 7 of infant 5 and sample of day 19 of infant 4 as previously observed in Figure 3. The dendrogram related to variables, obtained after infants clustering, showed two principal arms: one of them included clinical variables, hematological parameters, calprotectin, IL-1 β , IL-4, IL-13, immunoglobulins IgA and IgG $_3$, ibuprofen doses, and Hb and the second principal arm also divided including most of the cytokines, chemokines, and growth factors, the rest of the immunoglobulins, the birth weight, and the Hctc.

4. Discussion

In this pilot study, the bacterial composition of fecal samples obtained from five preterm infants supplemented with a probiotic mixture of two strains isolated from human milk during their earlier days of life at the NICU was assessed. In addition, a wide range of cytokines, chemokines, growth factors, and immunoglobulins were determined in all plasma, meconium, and fecal samples in order to describe their immunological profiles, their changes over time, and their potential relationship with bacterial colonization and clinical features.

The results obtained in this study suggest that the administration of *B. breve* PS12929 and *L. salivarius* PS12934 to preterm infants may increase the levels of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in their feces. In fact, *L. salivarius* PS12934 could be isolated from the fecal samples of the preterm infants from day 7 of intervention and its presence remained constant throughout the study. *B. breve* PS12929 was also isolated from fecal samples after day 14 of intervention and, since then, it had increasing presence in the fecal samples. The higher frequency and concentration of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in the feces analyzed should be considered a positive outcome of this study because the pattern of gut colonization in this specific infant population is usually characterized by a dominance of opportunistic pathogens and a reduced (or even absent) population of lactobacilli and bifidobacteria [7, 15, 38]. In fact, the SDI values of the fecal samples were higher than those previously described in a similar cohort that did not receive probiotics [7]. The intensive use of antibiotics at the NICU has been related to a dramatic reduction in microbial diversity and to increased presence of *Enterobacter* [39]; however, the administration of the probiotic strains in this study seemed to, somehow, compensate the antibiotic side effects.

Up to the present, there has been a complete lack of studies focused on fecal immunological parameters among preterm infants. As a consequence, there are no reference values for this population and, therefore, this study may constitute a starting point for future investigations. Although scarce, there are some studies dealing with blood immune

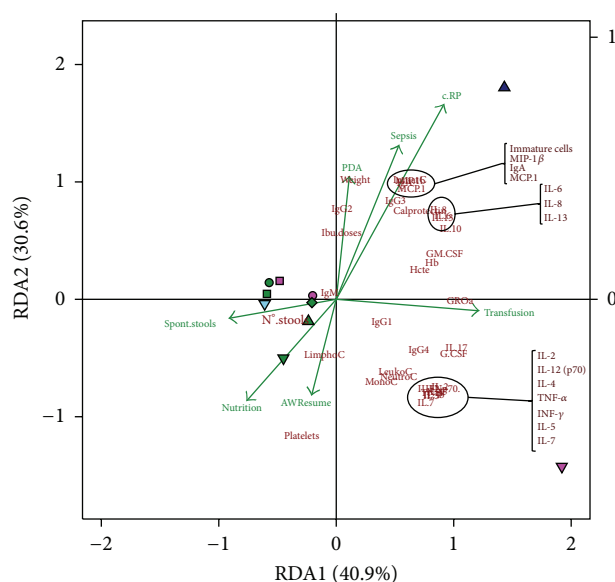


FIGURE 3: Redundancy analysis of the blood samples obtained at different sampling times from the preterm infants. Cases were represented with points and then labeled per infant (1: circle, 2: square, 3: diamond, 4: triangle, and 5: inverted triangle) and sampling time (0: medium violet red, 7: green, 14: midnight blue, and 21: sky blue). Quantitative variables matrix, including the hematological and immunological parameters, ibuprofen doses (Ibu.doses), number of stools per day (N°.stools), and weight, was represented with each variable name or abbreviator in dark red color; clinical categorized observations vectors matrixes were used as constrained variables (airway resume (AWResume), antibiotherapy (Antibiotics), C-RP, ibuprofen treatment (Ibu treatment), nutrition type (Nutrition), patent ductus arteriosus (PDA), Sepsis, spontaneous stools (Spont.stools), and Transfusion) and represented as vectors in green color. The bidimensional RDA plot explains the 71% of the variability and showed a P value of 0.010 after 199 permutations when ANOVA test of the model was performed.

compounds in preterm babies. Globally, they show that there are differences in the blood immune profiles depending on the infant gestational age [40–42]. It is important to note that the volume of the blood samples that are usually extracted from preterm neonates for clinical purposes is usually very low. Therefore, multiplex technologies, as the one used in this study, are required in order to be able to simultaneously analyze a high number of immune compounds [42, 43].

The results obtained in this study must be interpreted with caution due to three relevant limitations: the absence of a control group, a very small population size, and the scarcity of previous studies dealing with the immunological features of very low or extremely low weight birth infants and how they may be affected after a probiotic treatment. In this context, the levels of IL-8 found in a previous work focused on term neonates [44] were lower than those obtained in this study while those of IL-4 and IL-6 were similar; in contrast, the values of the remaining immunological parameters were higher in all the sampling times. This may illustrate the immune immaturity of these preterm infants. Similarly, levels of IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, TNF- α , IFN- γ , and MCP-1 were lower in preterm infants born at 30–32 weeks than in those born after 36 weeks, indicating a lower stimulation or activation of Th1 cells and antigen-presenting cells in preterm babies as the gestational age decreases [42]. In the present work, the concentrations of the chemokines IL-8 and MCP-1 and those of the cytokines IL-4, IL-10, and IL-13, which are related to anti-inflammatory processes, were higher than those reported for preterm neonates born at 30–32 weeks and

similar to those found in older infants (>36 weeks) [42]. This suggests that the administration of the probiotic strains may exert a modulatory effect on the immune system of these infants.

In addition, very low or extremely low weight birth infants usually require a strong and highly individualized medical intervention (antibiotics, oxygen, corticoids, ibuprofen, transfusions, etc.) for, at least, the first days of life due to a wide variety of life-threatening conditions. Such conditions, together with their corresponding treatments, may alter the microbial gut colonization process and, also, the infants' immune responses. Therefore, it is very difficult to obtain a homogeneous VLBW or ELBW infant population even in cohorts with a high number of infants. This is another important limitation that interventional studies, such as probiotic administration, must face when dealing with such infant subpopulations.

Despite all the limitations cited above, it is also true that a significant reduction of the inflammatory marker calprotectin in feces was observed throughout the probiotic treatment, which is in agreement with previous studies [3, 45, 46]. This is a promising outcome that must be reassessed in the future in a placebo-controlled intervention involving a large cohort.

The increase in IgA observed at day 7 may be due to the microorganisms colonizing the preterm gut, which triggers the production of this Ig by the gut-associated lymphoid tissue (GALT) [47]. IgA has the ability to penetrate the gut mucosal surface in conjunction with antigens and, as a

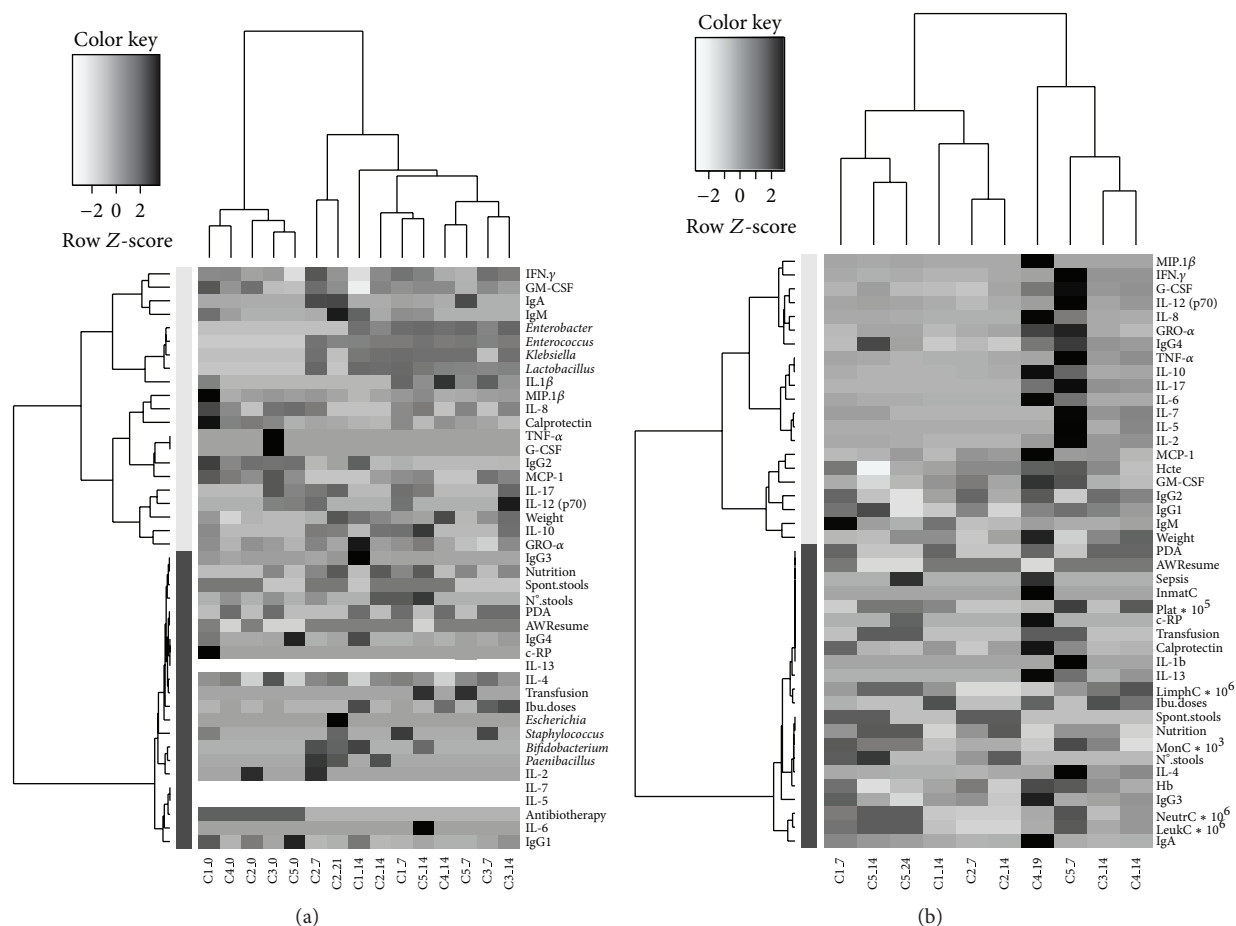


FIGURE 4: Heatmaps of fecal (a) and plasma (b) samples matrixes, considering all the quantitative variables measured and the categorized variables that were explained in the correspondent RDA, were performed. Clustering functions were applied to samples and variables after scaling the whole data set. In order to represent as much information as possible in the plot, the heatmaps were plotted using the measured data matrix scaled per variable and columns were labeled per infant and sampling time.

consequence, to induce effector immune responses, playing a key role in the maintenance of intestinal microbiota and immune homeostasis [48].

The multivariate analysis applied to all the available plasma and fecal samples from the five preterm infants revealed a clear relation between the parameters assessed in this work and the clinical evolution of the infants. In the fecal-related RDA, microbial colonization acted as the principal agent opposed to the levels of certain proinflammatory immunocompounds and in agreement with the clinical variables associated with an improvement of the infants' health. Since bacterial species coordinate coefficients had positive values in the RDA1 axis, calprotectin and other proinflammatory parameters, such as IL-8, MIP-1 β , MCP-1, G-CSF, or TNF- α , showed negative values. RDA1 axis coordinate coefficients for IgG₁, IgG₂, and IgG₄ were negative while those for the secretory IgA and IgM immunoglobulins were positive. Although these findings must be taken with caution due to the inherent limitations of this work and to the high number of potential interactions and confusing factors,

it should be noted that an abnormal gut microbial colonization predisposes the neonatal intestine to inflammation and to a cascade of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines responses [49]. On the other hand, the evolution of the infants' microbiota was different than that observed in other preterm infants devoid of probiotic treatment [7] but similar to that of preterm neonates that received probiotics [23].

Finally, the dendrograms obtained for samples and variables represented in the heatmaps (Figure 4) seem to reinforce the hypothesis that probiotic strains may contribute to the development of a normal gut bacterial colonization and that this process is essential to reduce the health burden associated with prematurity [50, 51]. Although the present cohort was very small, a promising influence of the probiotic supplementation on gut colonization was observed, including an increase in bacterial diversity and in the presence of lactobacilli and bifidobacteria at relatively high levels.

Although multicenter, randomized clinical trials involving bigger cohorts and longer intervention times with

these strains will be required to determine their efficacy in the prevention of sepsis or NEC, the results of this work may provide useful information for future studies dealing with probiotic gut colonization and, particularly, with the detection and quantification of fecal and blood immunocompounds in preterm infants.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Authors' Contribution

Laura Moles, Esperanza Escribano, and Javier de Andrés contributed equally to this work.

Acknowledgments

This work was supported by the Projects CSD2007-00063 (FUN-C-FOOD, Consolider-Ingenio 2010) and AGL2010-15420 from the Ministerio de Economía y Competitividad (Spain). Laura Moles is the recipient of a predoctoral grant from the same ministry. The authors would like to thank Pilar Amo and Milagros Gil for their contribution to samples and clinical data collection. Also their acknowledgement is due to the parents of the participants.

References

- [1] F. Magne, M. Abély, F. Boyer, P. Morville, P. Pochart, and A. Suau, "Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by sequences of 16S rRNA genes and PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles," *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 57, no. 1, pp. 128–138, 2006.
- [2] Y. Wang, J. D. Hoenig, K. J. Malin et al., "16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis," *ISME Journal*, vol. 3, no. 8, pp. 944–954, 2009.
- [3] C. Rougé, O. Goldenberg, L. Ferraris et al., "Investigation of the intestinal microbiota in preterm infants using different methods," *Anaerobe*, vol. 16, no. 4, pp. 362–370, 2010.
- [4] M. S. LaTuga, J. C. Ellis, C. M. Cotton et al., "Beyond bacteria: a study of the enteric microbial consortium in extremely low birth weight infants," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 12, Article ID e27858, 2011.
- [5] S. Arbolea, A. Binetti, N. Salazar et al., "Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates," *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 79, no. 3, pp. 763–772, 2012.
- [6] J. C. Hallab, S. T. Leach, L. Zhang et al., "Molecular characterization of bacterial colonization in the preterm and term infant's intestine," *Indian Journal of Pediatrics*, vol. 80, no. 1, pp. 1–5, 2013.
- [7] L. Moles, M. Gómez, H. Heilig et al., "Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 6, Article ID e66986, 2013.
- [8] R. Martín, A. J. Nauta, K. Ben Amor, L. M. Knippels, J. Knol, and J. Garssen, "Early life: gut microbiota and immune development in infancy," *Beneficial microbes*, vol. 1, no. 4, pp. 367–382, 2010.
- [9] J. L. Kaplan, H. N. Shi, and W. A. Walker, "The role of microbes in developmental immunologic programming," *Pediatric Research*, vol. 69, no. 6, pp. 465–472, 2011.
- [10] P. van Baarlen, J. M. Wells, and M. Kleerebezem, "Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli," *Trends in Immunology*, vol. 34, no. 5, pp. 208–215, 2013.
- [11] A. A. Sharma, R. Jen, A. Butler, and P. M. Lavoie, "The developing human preterm neonatal immune system: a case for more research in this area," *Clinical Immunology*, vol. 145, no. 1, pp. 61–68, 2012.
- [12] E. C. Claud and W. A. Walker, "Hypothesis: inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis," *The FASEB Journal*, vol. 15, no. 8, pp. 1398–1403, 2001.
- [13] M.-F. de la Cochetière, H. Piloquet, C. des Robert, D. Darmaun, J.-P. Galmiche, and J.-C. Rozé, "Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis in premature infants: the putative role of *Clostridium*," *Pediatric Research*, vol. 56, no. 3, pp. 366–370, 2004.
- [14] M.-J. Butel, A. Suau, F. Campeotto et al., "Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: a prospective analysis," *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, vol. 44, no. 5, pp. 577–582, 2007.
- [15] J. C. Madan, R. C. Salari, D. Saxena et al., "Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis," *Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition*, vol. 97, no. 6, pp. F456–F462, 2012.
- [16] A. Janvier, J. Malo, and K. J. Barrington, "Cohort study of probiotics in a North American neonatal intensive care unit," *Journal of Pediatrics*, vol. 164, no. 5, pp. 980–985, 2014.
- [17] N. D. Embleton and T. Skeath, "Probiotics for preterm infants on the NICU," *Paediatrics and Child Health*, vol. 24, no. 1, pp. 38–40, 2014.
- [18] Q. Wang, J. Dong, and Y. Zhu, "Probiotic supplement reduces risk of necrotizing enterocolitis and mortality in preterm very low-birth-weight infants: an updated meta-analysis of 20 randomized, controlled trials," *Journal of Pediatric Surgery*, vol. 47, no. 1, pp. 241–248, 2012.
- [19] G. Deshpande, S. Rao, S. Patole, and M. Bulsara, "Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates," *Pediatrics*, vol. 125, no. 5, pp. 921–930, 2010.
- [20] W. O. Tarnow-Mordi, D. Wilkinson, A. Trivedi, and J. Brok, "Probiotics reduce all-cause mortality and necrotizing enterocolitis: it is time to change practice," *Pediatrics*, vol. 125, no. 5, pp. 1068–1070, 2010.
- [21] H.-C. Lin, C.-H. Hsu, H.-L. Chen et al., "Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight preterm infants: a multicenter, randomized, controlled trial," *Pediatrics*, vol. 122, no. 4, pp. 693–700, 2008.
- [22] M. G. Romeo, D. M. Romeo, L. Trovato et al., "Role of probiotics in the prevention of the enteric colonization by *Candida* in preterm newborns: Incidence of late-onset sepsis and neurological outcome," *Journal of Perinatology*, vol. 31, no. 1, pp. 63–69, 2011.
- [23] R. Mohan, C. Koebnick, J. Schildt et al., "Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 44, no. 11, pp. 4025–4031, 2006.

- [24] Y. Ohashi and K. Ushida, "Health-beneficial effects of probiotics: its mode of action," *Animal Science Journal*, vol. 80, no. 4, pp. 361–371, 2009.
- [25] M. Millar, M. Wilks, P. Fleming, and K. Costeloe, "Should the use of probiotics in the preterm be routine?" *Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition*, vol. 97, no. 1, pp. F70–F74, 2012.
- [26] E. A. Cristofalo, R. J. Schanler, C. L. Blanco et al., "Randomized trial of exclusive human milk versus preterm formula diets in extremely premature infants," *The Journal of Pediatrics*, vol. 163, no. 6, pp. 1592.e1–1595.e1, 2013.
- [27] A. F. Ahrabi and R. J. Schanler, "Human milk is the only milk for premies in the NICU!" *Early Human Development*, vol. 89, no. 2, pp. S51–S53, 2013.
- [28] D. I. Tudehope, "Human milk and the nutritional needs of preterm infants," *Journal of Pediatrics*, vol. 162, no. 3, pp. S17–S25, 2013.
- [29] I. Levy, J. Comarsca, M. Davidovits, G. Klinger, L. Sirota, and N. Linder, "Urinary tract infection in preterm infants: the protective role of breastfeeding," *Pediatric Nephrology*, vol. 24, no. 3, pp. 527–531, 2009.
- [30] R. J. Schanler, C. Lau, N. M. Hurst, and E. O. Smith, "Randomized trial of donor human milk versus preterm formula as substitutes for mothers' own milk in the feeding of extremely premature infants," *Pediatrics*, vol. 116, no. 2, pp. 400–406, 2005.
- [31] R. Martín, M. Olivares, M. L. Marín, L. Fernández, J. Xaus, and J. M. Rodríguez, "Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk," *Journal of Human Lactation*, vol. 21, no. 1, pp. 8–17, 2005.
- [32] R. Martín, E. Jiménez, H. Heilig et al., "Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75, no. 4, pp. 965–969, 2009.
- [33] L. Fernández, S. Langa, V. Martín et al., "The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease," *Pharmacological Research*, vol. 69, no. 1, pp. 1–10, 2013.
- [34] M. Gueimonde, K. Laitinen, S. Salminen, and E. Isolauri, "Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation?" *Neonatology*, vol. 92, no. 1, pp. 64–66, 2007.
- [35] G. Solís, C. G. de los Reyes-Gavilan, N. Fernández, A. Margolles, and M. Gueimonde, "Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut," *Anaerobe*, vol. 16, no. 3, pp. 307–310, 2010.
- [36] S. Arbolea, P. Ruas-Madiedo, A. Margolles et al., "Characterization and *in vitro* properties of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-milk," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 149, no. 1, pp. 28–36, 2011.
- [37] V. Martín, A. Maldonado-Barragán, L. Moles et al., "Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces," *Journal of Human Lactation*, vol. 28, no. 1, pp. 36–44, 2012.
- [38] M. Mshvildadze, J. Neu, J. Shuster, D. Theriaque, N. Li, and V. Mai, "Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques," *Journal of Pediatrics*, vol. 156, no. 1, pp. 20–25, 2010.
- [39] C. Greenwood, A. L. Morrow, A. J. Lagomarcino et al., "Early empiric antibiotic use in preterm infants is associated with lower bacterial diversity and higher relative abundance of *Enterobacter*," *The Journal of Pediatrics*, vol. 165, no. 1, pp. 23–29, 2014.
- [40] A. Blanco-Quirós, E. Arranz, G. Solís, A. Villar, A. Ramos, and D. Coto, "Cord blood interleukin-10 levels are increased in preterm newborns," *European Journal of Pediatrics*, vol. 159, no. 6, pp. 420–423, 2000.
- [41] N. Matoba, N. Yu, K. Mestan et al., "Differential patterns of 27 cord blood immune biomarkers across gestational age," *Pediatrics*, vol. 123, no. 5, pp. 1320–1328, 2009.
- [42] S. Lusyati, C. V. Hulzebos, J. Zandvoort, H. Sukandar, and P. J. J. Sauer, "Cytokines patterns in newborn infants with late onset sepsis," *Journal of Neonatal-Perinatal Medicine*, vol. 6, no. 2, pp. 153–163, 2013.
- [43] N. Takahashi, R. Uehara, M. Kobayashi et al., "Cytokine profiles of seventeen cytokines, growth factors and chemokines in cord blood and its relation to perinatal clinical findings," *Cytokine*, vol. 49, no. 3, pp. 331–337, 2010.
- [44] G. Hodge, S. Hodge, R. Haslam et al., "Rapid simultaneous measurement of multiple cytokines using 100 µl sample volumes—Association with neonatal sepsis," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 137, no. 2, pp. 402–407, 2004.
- [45] S. Josefsson, S. K. Bunn, and M. Domellöf, "Fecal calprotectin in very low birth weight infants," *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, vol. 44, no. 4, pp. 407–413, 2007.
- [46] G. Aydemir, F. Cekmez, I. A. Tanju et al., "Increased fecal calprotectin in preterm infants with necrotizing enterocolitis," *Clinical Laboratory*, vol. 58, no. 7-8, pp. 841–844, 2012.
- [47] K. Suzuki, S.-A. Ha, M. Tsuji, and S. Fagarasan, "Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut," *Seminars in Immunology*, vol. 19, no. 2, pp. 127–135, 2007.
- [48] T. Rogosch, S. Kerzel, K. Hoß et al., "IgA response in preterm neonates shows little evidence of antigen-driven selection," *The Journal of Immunology*, vol. 189, no. 11, pp. 5449–5456, 2012.
- [49] V. Mai, R. M. Torrazza, M. Ukhanova et al., "Distortions in development of intestinal microbiota associated with late onset sepsis in preterm infants," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 1, Article ID e52876, 2013.
- [50] V. Mai, C. M. Young, M. Ukhanova et al., "Fecal microbiota in premature infants prior to necrotizing enterocolitis," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 6, Article ID e20647, 2011.
- [51] R. H. Siggers, J. Siggers, T. Thymann, M. Boye, and P. T. Sangild, "Nutritional modulation of the gut microbiota and immune system in preterm neonates susceptible to necrotizing enterocolitis," *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 22, no. 6, pp. 511–521, 2011.

IX. Discusión general



IX. 1. DIVERSIDAD BACTERIANA EN EL MECONIO, HECES Y CONTENIDO GÁSTRICO DE NIÑOS PREMATUROS

IX. 1. 1. Diversidad bacteriana intestinal durante las tres primeras semanas de vida

La colonización bacteriana del intestino infantil es un proceso fundamental para el individuo, ya que las interacciones que se establecen entre la microbiota intestinal y el hospedador tienen un papel decisivo, no sólo en su función intestinal sino también en su salud general. Por ello, esclarecer cómo se adquiere esta microbiota y describir su diversidad y función es un tema de gran interés. La colonización bacteriana del intestino humano es un proceso complejo y progresivo que se inicia, a pequeña escala, en las últimas fases del periodo fetal. Tras el nacimiento, se intensifica drásticamente debido al contacto del neonato con microorganismos procedentes de la microbiota vaginal, intestinal y/o mamaria de la madre y del medio ambiente que le rodea (Buddington et al., 2010; Mackie et al., 1999; Martin et al., 2007a; Martin et al., 2009). En consecuencia, diversos factores, como la composición de la microbiota materna, la EG, la forma y lugar de nacimiento, la medicación (particularmente los antibióticos) o la alimentación, juegan papeles claves en un proceso del que dependen funciones tan importantes como la absorción de nutrientes, la formación de una barrera frente a patógenos o el desarrollo del sistema inmunitario (Hooper y Gordon, 2001; Martino et al., 2008).

A diferencia de los RN a término, los prematuros se caracterizan por tener una gran inmadurez que se manifiesta, principalmente, por su incapacidad para mantener la temperatura corporal, la predisposición a infecciones, las dificultades respiratorias, la falta de reflejos necesarios para su supervivencia (como el de búsqueda, el de succión o el de deglución) y la intolerancia digestiva a alimentos que no sean la leche humana. No obstante, los avances en neonatología han conseguido reducir la mortalidad y morbilidad de los neonatos prematuros de forma significativa en los países desarrollados, así como reducir progresivamente el límite de EG en que un RN es considerado viable (Grzona et al., 2006; Powell et al., 2012; Hankins et al., 2013). El aumento del número de PPT observado en las últimas décadas pone de manifiesto la necesidad de mayor conocimiento sobre la prevención del PPT, así como sobre los problemas asociados al RN pretérmino, ya que pueden tener gran repercusión en generaciones futuras.

Los neonatos nacidos prematuramente están sometidos a múltiples factores que pueden alterar el proceso de colonización del intestino, incluyendo el tratamiento antibiótico de la madre inmediatamente antes del parto (por sospecha de corioamnionitis, por rotura prematura de membranas o

por colonización recto-vaginal por *Streptococcus agalactiae*), el tratamiento empírico con antibióticos tras el nacimiento (Madan et al., 2012; Schumann et al., 2005), la mayor frecuencia de parto por cesárea (nuevamente con administración de antibiótico a la madre), la separación de la madre, las maniobras invasivas (SNG, tubos endotraqueales, accesos vasculares) y la estancia prolongada en la UCIN con una elevada prevalencia de microorganismos hospitalarios potencialmente patógenos (Westerbeek et al., 2006). Los escasos trabajos existentes al iniciarse esta Tesis Doctoral sugerían que todos estos factores provocaban una gran distorsión en el patrón de colonización del intestino neonatal y que este hecho tenía consecuencias negativas para la pareja madre-hijo (Tanaka et al., 2009).

En la presente Tesis Doctoral se planteó como objetivo estudiar el establecimiento de la microbiota gastrointestinal en RN prematuros ingresados en una UCIN entre octubre de 2009 y julio de 2010 con un periodo de hospitalización que osciló entre 27 y 116 días. Inicialmente, se evaluó la sucesión de las especies bacterianas en el meconio y en las heces de 26 RN prematuros durante su estancia en la UCIN utilizando técnicas dependientes de cultivo. De los participantes en este estudio, se seleccionó una cohorte más pequeña de 14 individuos para realizar un análisis más exhaustivo de la microbiota intestinal del meconio y las heces a las 3 semanas de vida mediante técnicas moleculares (DGGE y micromatrices de DNA o HITChip). Al comparar los resultados obtenidos con técnicas independientes de cultivo con los recabados previamente utilizando técnicas dependientes de cultivo se observó que, en conjunto, se obtenían resultados muy similares.

Por lo general, los niños prematuros, debido a su inmadurez, presentan un retraso en el establecimiento de la colonización intestinal que, a menudo, se ha descrito como una situación aberrante en comparación con los niños sanos nacidos a término (Koenig et al., 2011; Palmer et al., 2007). Además, la colonización en estos RN prematuros parece ser específica de cada individuo y sin un patrón común entre ellos (Barrett et al., 2013). Esta microbiota aberrante parece afectar a la salud del niño y aumentar el riesgo de infecciones gastrointestinales, como la NEC (Claud y Walker, 2001; Siggers et al., 2011). El riesgo de sepsis en el RN prematuro se ha asociado a la dominancia de los filos *Proteobacteria* y *Firmicutes* (*Staphylococcus*) en las heces mientras que en individuos prematuros con mejor pronóstico, que sólo requieren la administración de antibiótico durante un periodo inferior a 3 días y no sufren sepsis, se observa un aumento en la frecuencia relativa de microorganismos anaerobios y un perfil microbiológico semejante al de niños sanos más maduros, incluyendo una presencia relativamente abundante de *Clostridium* y *Veillonella* (Madan et al., 2012).

Normalmente, la microbiota de los RN prematuros está dominada por bacterias cultivables que se encuentran de forma habitual en el ambiente hospitalario, donde existe un alto uso de antibióticos, como sucede en las

UCIN. Así, por ejemplo, la presencia de *Serratia* en heces de niños está fuertemente relacionada con parámetros hospitalarios, como la antibioterapia y la ventilación mecánica (Moles et al., 2013). De hecho, a pesar de que *Serratia* no es uno de los microorganismos más vigilados en el ambiente hospitalario, su presencia es especialmente importante en las UCIN, ya que sus infecciones se describen preferentemente en neonatos, especialmente en aquellos que no alcanzan los 1500 g o las 37 de EG (Jones et al., 2000, Voelz et al., 2010). En los RN prematuros, el temor a infecciones, y particularmente a las sepsis, determina, con frecuencia, un uso precoz de antibióticos de amplio espectro. Esta práctica aumenta el riesgo de colonización por bacterias multirresistentes (De Man et al., 2000), y se asocia, cada vez más, a ciertas complicaciones del prematuro, como el aumento de infecciones fúngicas y la alteración del patrón de colonización en un periodo crítico para la maduración intestinal e inmunológica; este hecho favorece el desarrollo de NEC o sepsis (Alexander et al., 2011; Greenwood et al., 2014; Kuppala et al., 2012; Tanaka et al., 2009). La gran influencia del ambiente en el que tienen que vivir estos niños durante sus primeras semanas de vida determina, en gran medida, la tendencia a la uniformidad en sus comunidades bacterianas mientras permanecen en la UCIN (Schwartz et al., 2003; La Tuga et al., 2011). Del mismo modo, se ha demostrado que la estancia en la UCIN y el régimen de antibioterapia son dos factores que influyen decisivamente en la colonización por clostridios, componentes habituales de la microbiota de los RN prematuros (Ferraris et al., 2012).

La combinación de las técnicas dependientes e independientes de cultivo permite estudiar en profundidad la microbiota de las muestras analizadas. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral muestran una buena correlación entre ambos tipos de técnicas, aunque la técnica de las micromatrices de DNA (HITChip) fue mucho más sensible y permitió la detección de una mayor diversidad bacteriana. Algunas de las discrepancias que se han apreciado en los resultados obtenidos con ambas técnicas pueden ser debidas a las diferencias existentes en la recuperación/supervivencia de distintos grupos bacterianos después de la descongelación de las muestras y a las complejas necesidades nutricionales de algunas especies para su cultivo. Otra diferencia entre los métodos microbiológicos tradicionales y los métodos moleculares podría ser producida por el sesgo introducido por la PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) debido a su alta sensibilidad cuando las especies se encuentran en una concentración muy baja en las muestras, según lo publicado en estudios anteriores (Rouge et al., 2010).

En general, el análisis del meconio de los RN prematuros reveló una alta variabilidad interindividual, en consonancia con los resultados obtenidos por otros autores (Gosalbes et al., 2013; Mshvildadze et al., 2010). La diversidad bacteriana en las muestras de meconio fue menor que en las de heces,

aunque los índices de diversidad obtenidos en ambos tipos de muestras mediante el HITChip fueron más altos que los descritos previamente en la bibliografía (Mshvildadze et al., 2010; Madan et al., 2012; Gosalbes et al., 2013).

En las muestras de meconio predominaron *Bacillus* y otros *Firmicutes*, mientras que en las de heces lo hizo *Proteobacteria*. A nivel de género, los más frecuentes en las muestras de meconio fueron *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactobacillus*, pero en las heces predominaron rápidamente los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, tales como *Escherichia*, *Klebsiella* y *Serratia*, como ya habían observado otros autores (Blakey et al., 1982; Gewolb et al., 1999; Jacquot et al., 2011; LaTuga et al., 2011; Magne et al., 2006; Moles et al., 2013; Mshvildadze et al., 2010; Sakata et al., 1985; Schwartz et al., 2003). En un trabajo previo en el que se analizaron muestras de meconio de RN a término sanos del mismo hospital, utilizando métodos dependientes de cultivo, las bacterias predominantes detectadas fueron *Escherichia coli* y *Leuconostoc* sp. (Jimenez et al., 2008b). Recientemente, Gosalbes et al. (2013) describieron esos mismos resultados en la microbiota de RN a término sanos mediante el empleo de técnicas moleculares. En cambio, en este trabajo, en las muestras de meconio de niños prematuros sólo se pudo detectar *E. coli* con el HITChip y, además, con una señal de baja intensidad, sin que se pudiera aislar por métodos de cultivo. Debe tenerse en cuenta que la congelación puede introducir sesgos en los métodos basados en el cultivo microbiológico, como se ha indicado anteriormente.

En los RN prematuros, la colonización por microorganismos anaerobios estrictos parece estar particularmente retrasada en comparación con la de los RN a término (Magne et al., 2006). Respecto a los clostridios, la colonización varía de un individuo a otro, mientras que los miembros de los géneros *Bacteroides* y *Bifidobacterium* sólo se han aislado o detectado en contadas ocasiones de las heces de estos niños (Campeotto et al., 2011; Jacquot et al., 2011; Rouge et al., 2010). Las bacterias anaerobias parecen ser especialmente sensibles a la administración de antibióticos, por lo que su mayor empleo en RN prematuros podría ser, al menos en parte, responsable de su retraso en la colonización intestinal (Greenwood et al., 2014; Arboleña et al., 2015). En este estudio, se aislaron bifidobacterias viables y también se detectó su DNA, aunque con una frecuencia baja. Un estudio anterior muestra que la EG tiene un impacto significativo en la colonización infantil por las bifidobacterias, ya que estas bacterias solo se detectan en niños nacidos con más de 33 semanas de gestación (Butel et al., 2007). Algunos autores han descrito una baja frecuencia relativa y una baja abundancia de bifidobacterias en la microbiota fecal a cualquier edad desde el nacimiento a la edad adulta (Palmer et al., 2007). Estos autores sugirieron que la importancia que se ha dado tradicionalmente a las bifidobacterias en los estudios y revisiones sobre microbiota gastrointestinal infantil puede ser desproporcionada de acuerdo con su prevalencia, abundancia y relevancia para la salud. Por el contrario,

otros estudios han llegado a conclusiones opuestas (Turroni et al., 2012) por lo que, en cualquier caso, este aspecto debería abordarse en futuros trabajos.

En general, nuestros resultados indican que el meconio de los RN prematuros alberga una microbiota específica, diferente a la de las heces obtenidas después de la primera semana de vida. Estudios anteriores han demostrado la presencia de una microbiota cultivable similar en muestras de sangre de cordón umbilical y meconio, recogidas en ambiente aséptico, de RN pretérmino y a término. Esto sugiere que el intestino fetal puede no ser estéril antes del parto y que, por lo tanto, al menos una parte de las bacterias que se encuentran en el meconio no tiene un origen postnatal (Ardisson et al., 2014; Jimenez et al., 2008c; Mshvildadze et al., 2010; Satokari et al., 2009). Según esta hipótesis, cada vez más aceptada, el conocimiento de la microbiota de los tejidos fetales puede ser determinante en el esclarecimiento de posibles causas desencadenantes del PPT.

Probablemente, estas bacterias podrían alcanzar el intestino fetal en el útero a través de la deglución de líquido amniótico. Estudios dependientes e independientes de cultivo han revelado que hay bacterias en el líquido amniótico humano sin rotura prematura de membranas (DiGiulio et al., 2008). Anteriormente, se había demostrado que la administración oral de una cepa de enterococos a ratonas gestantes determinaba su presencia tanto en el líquido amniótico obtenido por cesárea como en el meconio (Jimenez et al., 2008c). Este hecho no debe sorprender, ya que hace bastantes años se describió que las bacterias del tracto digestivo pueden llegar al líquido amniótico a través de la circulación sanguínea (Kornman y Loesche, 1980). En otro estudio llevado a cabo en mujeres embarazadas se investigó la influencia de la composición de su microbiota oral durante el embarazo (Dasanayake et al., 2005). En él se mostró que algunas bacterias como, por ejemplo, *Actinomyces naeslundii* se asocian a un menor peso al nacer y a un PPT mientras que otras, como los lactobacilos, están vinculadas a un mayor peso al nacer y partos a término. Los resultados de estos estudios sugirieron que las bacterias orales pueden entrar en el ambiente uterino a través del torrente sanguíneo e influir en el parto (Dasanayake et al., 2005).

Entre las bacterias dominantes en las muestras de meconio cabe citar a estreptococos y estafilococos, cuya presencia ya había sido descrita con anterioridad en muestras de corioamnios de madres sanas sometidas a cesárea (Bearfield et al., 2002). La traslocación bacteriana en el intestino materno, que tiene lugar durante el embarazo y la lactancia, podría explicar la presencia bacteriana tanto en la placenta como el tejido mamario. Este primer acercamiento puede ser determinante en la preparación del feto para el contacto con el mundo microbiano a su nacimiento (Pérez et al., 2007; Reid et al., 2014), señalando la importancia de la microbiota en su desarrollo. Por otra parte, la perturbación de la microbiota de estos tejidos puede tener consecuencias en el correcto desarrollo gestacional, por lo que la

determinación del papel bacteriano en el establecimiento y evolución del embarazo es clave para elucidar su relación con adversidades en la gestación. La más que posible iniciación de la colonización intestinal durante la etapa fetal constituye un tema de investigación emergente ya que podría tener notables implicaciones para la salud; por ejemplo, la modulación de la microbiota fetal durante el embarazo podría contribuir a reducir el porcentaje de nacimientos prematuros.

IX. 1. 2. Evolución de la microbiota de los recién nacidos prematuros: seguimiento a los 2 años de edad

La composición de la microbiota intestinal sufre grandes cambios a lo largo de nuestra vida (Harmsen et al., 2000; O'Toole y Claesson, 2010; Woodmansey, 2007). Como se ha comentado al comienzo de este capítulo, el período más dinámico de cambio se ha establecido después del nacimiento, cuando las escasas bacterias presentes intraútero ceden espacio a una comunidad microbiana intestinal compleja. La composición microbiana del colon de los RN a término está inicialmente dominada por microorganismos anaeróbicos facultativos que, en cuestión de días, generan un ambiente reductor que favorece el desarrollo de bacterias anaerobias estrictas (Fanaro et al., 2003; Mackie et al., 1999). La comunidad bacteriana intestinal del RN, caracterizada por una baja diversidad y complejidad bacterianas, se desarrolla gradualmente y madura hasta alcanzar un estado adulto perdurable alrededor de los 2-3 años de edad (Koenig et al., 2011; Matamoros et al., 2013). No obstante, el establecimiento y el desarrollo de la microbiota intestinal en RN prematuros difiere de la de RN a término sanos. La colonización anormal que sufren los RN prematuros en los primeros días de vida puede afectar a la maduración de la barrera epitelial así como a las funciones nutricionales e inmunológicas del intestino (Di Mauro et al., 2013; Sharma et al., 2010); de igual modo, puede afectar a la composición de la microbiota intestinal a medio y largo plazo.

En un trabajo paralelo al de esta Tesis Doctoral se comparó la composición bacteriana de meconio y heces de la tercera semana de vida de los RN prematuros estudiados previamente con la de heces obtenidas de los mismos niños a los dos años de edad. Mientras que en las muestras de meconio y heces de la tercera semana de vida se había constatado una baja diversidad bacteriana y una alta variabilidad interindividual, en las muestras de heces de esos individuos tomadas a los dos años se observó lo contrario. En general, las comunidades bacterianas evolucionaron hacia una microbiota similar a la de individuos adultos, con mayor número de especies y menores diferencias interindividuales, como corresponde al desarrollo normal de la microbiota de niños sanos nacidos a término a medida que crecen (Palmer et al., 2007). Aquellos géneros de bacterias relacionados con el ambiente

hospitalario, como *E. coli*, *Klebsiella* o *Serratia*, que se encontraban presentes en las muestras fecales de los niños ingresados en la UCIN, habían sido reemplazados al cabo de dos años por géneros bacterianos pertenecientes a los grupos IV y XIVa de *Clostridium*. El predominio de estos grupos bacterianos es un aspecto distintivo de enterotipos adultos caracterizados por una microbiota compleja con un lento reemplazo, un bajo potencial redox y una producción relativamente alta de ácidos grasos de cadena corta (Hao y Lee, 2004).

Como se ha mencionado previamente, la diversidad bacteriana intestinal de los niños prematuros aumentó con la edad, de acuerdo con lo descrito por otros autores en distintas poblaciones (Yatsunen et al., 2012). Además, al comparar los datos obtenidos con los almacenados en la base de datos de la micromatriz de DNA utilizada (HITChip) se observó que la diversidad bacteriana presente en las heces de RN prematuros a los 2 años de edad era similar a la de niños sanos de 2-4 años e inferior a la de adultos. El patrón de colonización intestinal va sufriendo cambios notables hasta los 2 o 3 años de vida, momento en el que la microbiota intestinal se estabiliza y comienza a parecerse a la de la edad adulta (Koenig et al., 2011; Wilks, 2007). Sin embargo, en este estudio, la diversidad de la microbiota intestinal en los niños prematuros a los 2 años no ha alcanzado todavía los atributos de la microbiota adulta.

El tratamiento con antibióticos retrasa o impide la colonización con *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Bennet et al., 2002; Gewolb et al., 1999; Penders et al., 2006). Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indican que esto puede ser un efecto a largo plazo de la prematuridad, ya que, a los 2 años de edad, la abundancia relativa de las bifidobacterias seguía siendo baja, incluso ausente en el caso de los lactobacilos.

Hay evidencias de que la colonización microbiana intestinal y la programación metabólica e inmunológica resultantes pueden tener una influencia duradera sobre el riesgo de enfermedades futuras (Matamoros et al., 2013). No obstante, aún no se conoce completamente cómo influye la microbiota intestinal sobre el sistema inmunitario y cómo afecta la colonización inicial del intestino en la maduración inmunitaria (Johansson et al., 2012), sobre todo en RN prematuros (Jacquot et al., 2011). Diversos estudios han descrito componentes inmunológicos en saliva, sangre de cordón umbilical o sangre periférica de RN a término y prematuros (Blanco-Quiros et al., 2000; Johansson et al., 2012; Lusiyati et al., 2013; Matoba et al., 2009; Sjogren et al., 2009; Wan et al., 2003) mostrando perfiles inmunológicos distintos en función de la EG. Sin embargo, muy pocos autores han investigado la presencia de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento e inmunoglobulinas en heces de RN prematuros (Mohan et al., 2008; Richter et al., 2010; Westerbeek et al., 2011). Es por ello que se analizó la presencia de una amplia gama de componentes inmunológicos en meconio y heces de RN prematuros y heces

de estos mismos niños a los 2 años de edad, siendo este el primer estudio conocido que persigue este objetivo. Resulta interesante que cada tipo de muestra analizada (meconio, heces de la primera y tercera semana de vida y heces a los dos años de edad) mostrara un perfil de expresión de componentes inmunológicos diferencial, aunque no se pudo identificar ningún componente en particular que cambiase significativamente entre las muestras tomadas en los distintos tiempos.

Tras el nacimiento, la producción de IgA es una respuesta de las células plasmáticas del tejido linfoide asociado al intestino a la colonización bacteriana intestinal (Suzuki et al., 2007). Este hecho explicaría el notable incremento observado en la concentración de IgA en las muestras de heces obtenidas en la primera semana tras el nacimiento en comparación con la detectada en el meconio de los RN prematuros. Por otra parte, las glándulas mamarias lactantes forman parte del sistema inmunitario secretor y la presencia de anticuerpos del tipo IgA en la leche materna refleja la estimulación antigénica de la mucosa asociada al tejido linfoide (Brandtzaeg, 2010). Los anticuerpos de la leche materna son, por lo tanto, muy específicos contra los agentes infecciosos y otros antígenos exógenos en el entorno de la madre, que son los primeros que entran en contacto con el neonato (Mohan et al., 2008). Por lo tanto, la lactancia materna representa una integración inmunitaria perfecta entre madre e hijo (Brandtzaeg, 2010; Castellote et al., 2011; Garofalo, 2010; Tomicic et al., 2010). Este hecho pone de manifiesto la importancia de la disponibilidad de la leche de la propia madre o de donantes para alimentar a los RN prematuros, una población que, como ya se ha descrito, es especialmente sensible a las enfermedades infecciosas e inflamatorias. Cabe señalar que una colonización microbiana intestinal anormal predispone al intestino del RN prematuro a la inflamación y a la activación de las cascadas de citoquinas pro- y antiinflamatorias (Mai et al., 2013). La capacidad de las IgAs para penetrar en la superficie de la mucosa intestinal en conjunción con antígenos y, como consecuencia, para inducir respuestas inmunitarias efectoras desempeña un papel clave en el mantenimiento de la microbiota intestinal y de la homeostasis inmunitaria (Rogosch et al., 2012).

IX. 1. 3. Diversidad bacteriana gástrica durante el primer mes de vida

Hasta la fecha, el estudio de la colonización del TGI se ha centrado mayoritariamente en el intestino debido, seguramente, a la mayor complejidad de su microbiota. El estómago ha sido clásicamente considerado un nicho microbiano inhóspito, que ha necesitado de los avances tecnológicos para la descripción de una microbiota diversa, dominada por los filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Fusobacteria*, siendo los géneros dominantes *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Prevotella*

(Abreu y Peek, 2014; Avilés-Jimenez et al., 2014; Bik et al., 2006; Dicksved et al., 2009; Engstrand y Lindberg, 2013; Mattarelli et al., 2014; Wang et al., 2014). Los escasos estudios realizados sobre la microbiota gástrica se han llevado a cabo en adultos, colonizados o no por *Helicobacter pylori* (Abreu y Peek, 2014; Avilés-Jiménez et al., 2014; Bik et al., 2006; Dicksved et al., 2009; Engstrand y Lindberg, 2013; Mattarelli et al., 2014; Okamoto et al., 2014; Wang et al., 2014). El estómago del neonato, y más concretamente el del RN prematuro, se caracteriza por la ausencia de una motilidad rítmica o periódica, su lento vaciado y su pH relativamente alto (5,5-7,0), hechos que pueden ser determinantes en el establecimiento de su microbiota (Milisavljevic et al., 2013; Montgomery et al., 1999; Thomson et al., 1997). En muchas ocasiones, los prematuros necesitan que los alimentos les sean suministrados mediante SNG hasta que alcanzan la madurez necesaria para ser amamantados o para succionar un biberón. Este hecho convierte al estómago en la principal puerta de entrada de microorganismos procedentes del ambiente externo. Como sucede en el intestino, la alteración de la microbiota gástrica puede incrementar la susceptibilidad a padecer enfermedades (Claud et al., 2001; de la Cochetiere et al., 2004). La escasa información disponible sobre la colonización gástrica de los niños prematuros hizo que uno de los objetivos planteados en la presente Tesis Doctoral fuese la evaluación de la diversidad bacteriana presente en el contenido gástrico en esta población.

La determinación de la microbiota gástrica se llevó a cabo en una cohorte de 13 niños de la población descrita anteriormente, con una EG media de 28 semanas (oscilando entre 24 y 32 semanas) y un peso medio al nacer de 1.192 g (entre 720 y 2.030 g). Se estudiaron 39 muestras de contenido gástrico mediante técnicas de cultivo. Las muestras se tomaron semanalmente desde el nacimiento hasta el final del primer mes de permanencia en el hospital. Las muestras se recogieron mediante aspirado por la SNG. Entre los resultados obtenidos por cultivo destacó la presencia de diversas especies de los géneros *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Escherichia*. Todos ellos mostraron tendencia a aumentar, tanto en concentración como en frecuencia, desde el nacimiento. El perfil bacteriano encontrado mostró gran variabilidad interindividual. Sin embargo, curiosamente, las especies dominantes fueron las mismas encontradas previamente en las heces de esos mismos niños: *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus epidermidis*, seguidas por *Serratia marcescens*, *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

Paralelamente, se analizaron las mismas muestras empleando una técnica independiente de cultivo, concretamente la secuenciación masiva, para obtener una visión más amplia de su complejidad. Para ello, se seleccionó un subconjunto de 15 contenidos gástricos de la primera y cuarta semana de vida. Se detectaron 8 filos diferentes pero solo 3 de ellos (*Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*) y 4 clases

(*Gammaproteobacteria*, *Bacilli*, *Actinobacteria* y *Alphaproteobacteria*) estaban representadas en un porcentaje mayor al 0,5% de las lecturas totales. Los géneros dominantes incluyeron *Serratia* y *Klebsiella* (clase *Gammaproteobacteria*), *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Lactobacillus* (clase *Bacilli*) y *Corynebacterium* (clase *Actinobacteria*). En general, los resultados mostraron una buena correlación con los obtenidos mediante las técnicas de cultivo, aunque las técnicas moleculares fueron capaces de detectar una diversidad bacteria más amplia.

El estudio microbiómico se amplió a algunas muestras de los alimentos que recibieron los niños (leche de la propia madre, leche donada), ya que ambos tipos de leche suelen compartir su paso por la SNG y el contenido bacteriano de las muestras de alimento podría estar alterando la composición de aquéllas de contenido gástrico. En general, se observó que tanto las muestras de contenido gástrico como las de los alimentos compartían un alto grado de similitud a nivel de filo y clase. Sin embargo, el análisis detallado de los grupos minoritarios (<0,5% de las lecturas y presentes en, al menos, dos muestras) mostró marcadas diferencias dependiendo del tipo de muestra. Por ejemplo, únicamente se detectaron secuencias relacionadas con los géneros *Facklamia*, *Kocuria*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Balneimonas*, *Caulobacter*, *Micoplana*, *Halomonas*, *Raoultella*, *Shewanella* y *Mycoplasma* en las muestras de contenido gástrico, mientras que sólo se detectaron secuencias pertenecientes a los géneros *Dialister* y *Rhizobium* en las de leche.

El recuento bacteriano en el material luminal del estómago normalmente oscila entre un valor no detectable y 10^6 UFC/ml (Riedel et al., 2014), dependiendo de factores como la zona del estómago estudiada, el pH gástrico en el momento del muestreo, la dieta o la etnia (Maldonado-Contreras et al., 2011; Riedel et al., 2014). El rango de valores obtenido en estas tipo de muestras fue amplio y estuvo comprendido en el rango citado anteriormente. El descubrimiento de *Helicobacter*, y el consecuente interés por los mecanismos que permiten su adaptación al ambiente gástrico, ha impulsado el estudio del microbioma de este órgano (Abreu y Peek, 2014; Avilés-Jiménez et al., 2014; Bik et al., 2006; Dicksved et al., 2009; Engstrand y Lindberg, 2013; Mattarelli et al., 2014; Wang et al., 2014). Estos estudios han mostrado una microbiota mucho más compleja de lo esperado, confirmando la presencia de miembros de los filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Fusobacteria*, además de algunos miembros del filo *Bacteroidetes*. Diversas especies de los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Veillonella* y *Prevotella* parecen dominar el estómago de individuos sanos, mientras que *Helicobacter* es el género más abundante en aquellos colonizados por este microorganismo. El gran número de microorganismos que pasan diariamente por nuestro estómago ($>10^{10}$ UFC) dificultan la distinción entre verdaderos residentes y transeúntes. Sin embargo, el estudio del microbioma ha desvelado que la presencia de secuencias bacterianas en el

estómago no es una mezcla aleatoria de microorganismos presentes en el tracto bucofaríngeo o en esófago, sino que se caracteriza por comunidades bacterianas adaptadas específicamente a este ambiente (Bik et al., 2006; Willems et al., 2011; Delgado et al., 2014).

Las diferencias anatómicas y fisiológicas entre el estómago de los adultos, de los RN a término y de los prematuros, junto con los factores ambientales y médicos, pueden ser determinantes en la composición de la microbiota gástrica de estos últimos (Thomson et al., 1997; Montgomery et al., 1999; Milisavljevic et al., 2013). Nuestros resultados muestran la predominancia de los filos *Firmicutes* y *Proteobacteria* en el contenido gástrico, tal y como se había descrito previamente (Milisavljevic et al., 2013), aunque la prevalencia de *Firmicutes* en trabajos previos fue mayor (50% de las lecturas) a la detectada en el nuestro, en el que *Proteobacteria* fue el filo dominante (33%). Todos los géneros pertenecientes al filo *Firmicutes* detectados por Milisavljevic et al. (2013) también estuvieron presentes en nuestras muestras mientras que, en el caso de los géneros del filo *Proteobacteria*, la coincidencia no fue total. En cuanto al filo *Actinobacteria*, *Corynebacterium* fue el género más abundante en ambos trabajos. La presencia de anaerobios facultativos (estreptococos, estafilococos, bacterias lácticas, enterobacterias...) es una característica distintiva del TGI de neonatos, mientras que el de los adultos está dominado por anaerobios estrictos (Abreu y Peek., 2014; Avilés-Jiménez et al., 2014; Bik et al., 2006; Dicksved et al., 2009; Engstrand y Lindberg, 2013; Mattarelli et al., 2014; Wang et al., 2014).

La colonización de las superficies internas de los tubos empleados para la alimentación enteral con microorganismos propios del ambiente hospitalario representa una fuente de contaminación para los alimentos que se administran a través de ellos durante los días que permanece colocada en el prematuro. Este hecho podría explicar la similitud existente entre el perfil bacteriano de las muestras de contenido gástrico y el de los alimentos analizados en esta Tesis.

IX. 1. 4. Colonización del intestino de los niños prematuros por clones de alto riesgo y evolución a los dos años

El ecosistema microbiano intestinal desempeña un papel importante en la salud por lo que su alteración, especialmente en las primeras etapas de la vida, puede ser un factor importante en el desarrollo de diversas enfermedades a posteriori (Arrieta et al., 2014). Tras el nacimiento, el establecimiento de una microbiota intestinal fisiológica resulta esencial para la maduración del sistema inmunológico innato y para la creación de una barrera de protección frente a posibles patógenos (Faith et al., 2013; Collado et al., 2012). Como se ha comentado anteriormente, este proceso se puede

ver afectado por numerosos factores, como la antibioterapia, el nacimiento por cesárea, la separación temprana de la madre, la alimentación con fórmula, los tratamientos médicos invasivos y/o una estancia prolongada en una UCIN (Penders et al., 2006). Tales factores suelen presentarse en los bebés prematuros, por lo que no es extraño que su microbiota intestinal se caracterice por una diversidad bacteriana muy reducida en comparación con la de los nacidos a término (Magne et al., 2006; Westerbeek et al., 2006; Moles et al., 2013).

Durante su estancia en la UCIN, los bebés prematuros están expuestos a las bacterias propias del entorno hospitalario, que se suelen caracterizar por su resistencia a antibióticos clínicamente relevantes y que, en consecuencia, se consideran clones de alto riesgo. Los clones de alto riesgo más prevalentes pertenecen al grupo ESKAPE (acrónimo de *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.) (Pendleton et al., 2013; Boucher et al., 2009). Aunque estudios previos han evaluado la colonización fecal de los niños prematuros con este tipo de bacterias, poco se sabe acerca de su evolución tras el alta hospitalaria. Por este motivo, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue estudiar la presencia de clones de alto riesgo durante la admisión de los niños en la UCIN y evaluar su posible persistencia a los 2 años, una edad en la que la microbiota infantil empieza a parecerse a la de un adulto (Arumugam et al., 2011; Lagier et al., 2015).

En general, se detectó una alta proporción de clones de alto riesgo asociados con infecciones nosocomiales, tanto en la leche que se administraba a los lactantes (independientemente de que fuese de la propia madre, donada o de fórmula), como en sus heces. En la UCIN donde se reclutaron los prematuros, las fórmulas se emplean esterilizadas, listas para su empleo y son de un solo uso, mientras que la leche donada se pasteuriza y, a continuación, se somete a estrictos controles microbiológicos. Por lo que respecta a la leche de la propia madre (que se almacena congelada pero no se pasteuriza), se ha descrito que la leche humana contiene una microbiota propia (Martín et al., 2012; Fernández et al., 2013), pero su composición y concentración difieren considerablemente de los resultados obtenidos en esta Tesis. Los distintos tipos de leche habían sido procesados y almacenados correctamente por lo que la carga bacteriana no podía atribuirse a una continua contaminación de los alimentos por parte del personal. Sin embargo, dado que todas las muestras de leche se habían obtenido tras su paso por la primera parte del sistema de alimentación enteral, la contaminación podía proceder de un crecimiento bacteriano rápido en las superficies internas de los tubos que conforman dichos sistemas. En consecuencia, se investigó si los sistemas de alimentación enteral eran la fuente de las bacterias aisladas en las distintas muestras de leche, incluyendo las fórmulas. Los resultados obtenidos,

que confirmaron las sospechas iniciales, constituyeron otra parte de la Tesis y se discuten posteriormente (sección X.1.5).

Las sepsis son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en las UCIN y su prevención y tratamiento suponen un coste sanitario elevado (Bhutta et al., 2014). *S. epidermidis* es la especie que causa un mayor número de brotes en las UCIN, seguida de *K. pneumoniae*, *Serratia* spp., *E. coli* y *Enterococcus* spp. Dentro de ellas, los clones de alto riesgo bien adaptados al ambiente hospitalario, que exhiben resistencia a antibióticos y que contienen factores de virulencia, son particularmente relevantes (Willems et al., 2011). En esta Tesis, se estudió la estructura y principales características de las poblaciones de *E. faecalis*, *E. faecium*, *S. aureus*, *E. coli* y *K. pneumoniae*, ya que, junto con las de *S. epidermidis* y *S. marcescens*, fueron las especies más frecuentes en las muestras analizadas. La colección de aislados de *S. epidermidis* y *S. marcescens* se reservó para un futuro trabajo debido a su gran abundancia, en el primer caso, y a la dificultad para su lisis/genotipado, en el segundo.

Diversos estudios de epidemiología molecular basados en esquemas MLST (del inglés *Multi Locus Sequencing Type*) han demostrado que los patógenos nosocomiales se suelen agrupar en determinados linajes, como el CC10 en *E. coli*, el ST258 en *K. pneumoniae*, los CC2/CC9 en *E. faecalis*, el CC17 en *E. faecium* o los CC5/CC8/CC30/CC45 en *S. aureus* (Willems et al., 2011). En esta Tesis, la proporción de estos clones de alto riesgo fue elevada en las muestras de heces y leche, así como en las muestras de contenido gástrico, aunque la sustitución clonal observada pudo ser la responsable de la ausencia de situaciones epidémicas en la UCIN durante la realización del estudio.

A pesar del elevado número de aislados de enterococos obtenidos (564 de *E. faecalis* y 108 de *E. faecium*), su diversidad genética fue baja ya que se reducía a 8 STs de *E. faecalis* y 3 de *E. faecium*; en contraste, los aislados pertenecientes a especies de los restantes géneros mostraron una mayor variabilidad (7 STs de *S. aureus* a partir de 7 niños, 10 STs de *E. coli* y 12 STs de *K. pneumoniae*). Solamente los clones ST64 y ST40 de *E. faecalis* persistieron durante casi todo el período estudiado, lo que permite deducir que las medidas epidemiológicas implantadas de forma rutinaria en la UCIN eran adecuadas.

Respecto a los aislados correspondientes a *S. epidermidis*, su caracterización no se ha finalizado por completo y, en consecuencia, los resultados obtenidos con esta especie no se incluyen en esta Tesis Doctoral. No obstante, los aislados de *S. epidermidis* fueron los que mostraron una mayor diversidad entre las especies estudiadas. Todos los niños fueron colonizados por esta especie durante el primer mes de vida. El tipado por la técnica de MLST ha permitido la descripción de, como mínimo, 8 ST nuevos y la detección de 22 previamente conocidos; el número de diferentes STs presentes en un mismo

niño osciló entre 1 y 7. Pese a la mayor prevalencia de clones relacionados con el ambiente hospitalario, cabe destacar la presencia de clones de la comunidad (33%). La elevada prevalencia de *S. epidermidis* en la leche humana (Hunt et al., 2011; Jost et al., 2013; Ward et al., 2013) puede ser responsable de su presencia y, de hecho, la mayoría de este tipo de aislados procedían de muestras de leche de la propia madre. En cualquier caso, como se ha comentado anteriormente, los clones más frecuentemente detectados a lo largo de la Tesis fueron aquellos propios del ambiente hospitalario.

Por otra parte, el estudio de la colección de aislados de *Serratia* spp. tiene interés por su estrecha relación con la población de niños prematuros y las UCIN, así como por ser un género escasamente estudiado pero que causa problemas con relativa frecuencia en el ambiente hospitalario. Los aislados de *S. marcescens* observados en las muestras del primer mes de vida de los niños (n= 130) se redujeron por PFGE (del inglés *Pulse Field Gel Electrophoresis*) a tan sólo 7 perfiles distintos. Cabe destacar su alta prevalencia en muestras de leche humana, posiblemente por el frecuente empleo de bombas para su extracción y los, a menudo, largos tiempos de conservación hasta su administración. Dos de los niños del estudio sufrieron sepsis causadas por *Serratia* y el perfil de PFGE de los aislados causantes de las bacteriemias fue el mismo. Este perfil pudo recuperarse en las heces, no sólo de los niños que presentaron la enfermedad, sino a partir de muchos otros, especialmente en la segunda mitad del periodo de recogida de muestras. La ausencia de esquema MLST para *Serratia* limita su caracterización a nivel epidemiológico. Sin embargo, los antibiogramas realizados a varios representantes de cada uno de los perfiles de PFGE mostraron que, en general, tenían una elevada sensibilidad a los antibióticos empleados con mayor frecuencia en el ambiente hospitalario.

Todos los niños, a excepción de uno, recibieron tratamiento antibiótico empírico. A pesar de que el uso profiláctico de los antibióticos, inmediatamente después del nacimiento, ejerce una influencia negativa sobre la colonización intestinal temprana y a que su efecto protector no ha sido demostrado aún (Tagare et al., 2010), una antibioterapia correcta puede resultar decisiva para asegurar la supervivencia de muchos RN prematuros. Sin embargo, parece igualmente obvio que esta práctica rutinaria permite la selección de bacterias resistentes a los antibióticos que, posteriormente, podrían llegar a ser dominantes, incluso a largo plazo, en el intestino del huésped (Costello et al., 2013). Para dilucidar esta cuestión, se evaluó la posible persistencia de los clones de alto riesgo (resistentes a antibióticos y adquiridos durante la estancia en la UCIN) en la misma cohorte de niños, una vez que alcanzaron los 2 años de edad. Los clones de alto riesgo presentes inicialmente apenas se pudieron detectar en las muestras de heces recogidas a los dos años; en contraste, los aislados mayoritarios pertenecían a clones que

no se habían detectado durante las tres primeras semanas de vida y que son característicos de la comunidad, como *E. coli* ST131, ST10-CC10 o ST3570-CC23.

Generalmente se suele asumir que los primeros aislados bacterianos que llegan al intestino durante o después del parto tienen un efecto fundacional y, por lo tanto, tienden a persistir como miembros de la microbiota intestinal durante toda la vida del hospedador (David et al., 2014). Sin embargo, nuestros resultados indican que, a pesar de la existencia de presiones selectivas tan importantes en el desarrollo de la microbiota intestinal de los prematuros, los linajes de alto riesgo iniciales (nosocomiales y resistentes a los antibióticos) presentes en sus heces habían sido reemplazados por otros (de la comunidad y sensibles a los antibióticos) cuando tenían 2 años, un momento en el que disminuyen las perturbaciones que caracterizan su colonización temprana y en el que, de hecho, la microbiota empieza a parecerse a la de un individuo adulto (Koenig et al., 2011; Yatsunen et al., 2012).

El empleo de técnicas de cultivo durante la realización de esta Tesis Doctoral permitió el aislamiento y caracterización de una amplia colección de aislados bacterianos relacionados con el ambiente hospitalario. En general, la presencia de clones de alto riesgo fue elevada, tanto en las muestras de contenido gástrico como en las de heces de los prematuros. La gran similitud entre ambos tipos de muestras podría deberse a las condiciones de hipoclorhidria gástrica característica del prematuro. En adultos con esta problemática se ha observado un aumento en la presencia de bacterias propias del intestino en muestras gástricas (Wang et al., 2014).

IX. 1. 5. Influencia de los sistemas de alimentación enteral en la microbiota de los alimentos recibidos por los recién nacidos prematuros

Uno de los principales factores que influyen en la colonización intestinal de los RN es la alimentación, como se ha indicado anteriormente. No hay duda de que la leche materna es la mejor opción para el crecimiento y el desarrollo de los RN sanos (Agostoni et al., 2009; *American Academy of Pediatrics*, 2012). En los RN prematuros, la leche materna es igualmente la mejor opción aunque, en algunos casos, debe fortificarse para cubrir las necesidades nutricionales de estos niños. Cuando no se dispone de leche de la propia madre, puede utilizarse leche donada o una fórmula infantil (*American Academy of Pediatrics*, 2012; Arslanoglu et al., 2013). Sin embargo, en la práctica diaria lo habitual suele ser que estos RN prematuros reciban distintos tipos de leche y en distinta cantidad y frecuencia según la disponibilidad, el estado de salud del niño y la organización de la UCIN.

La falta de coordinación de la succión, la respiración y la deglución hace que muchos RN prematuros deban recibir la alimentación enteral a través de

SNG hasta que alcanzan la madurez necesaria para alimentarse directamente del pecho de la madre o de un biberón. Pocos estudios han evaluado el papel de las tubuladuras y las SNG neonatales como reservorio para la colonización bacteriana y, en consecuencia, su papel como una fuente de bacterias para el intestino de los RN prematuros. Sin embargo, los pocos existentes muestran una presencia constante de estafilococos (*S. epidermidis*, *S. aureus*), enterococos (*E. faecalis*, *E. faecium*) y enterobacterias (*K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*...) en las superficies internas de la mayoría de las sondas de nutrición enteral analizadas y, entre estos microorganismos, se incluyen algunos clones que contienen genes de resistencia a antibióticos (Hurrell et al., 2009; Mehall et al., 2002a; Mehall et al., 2002b). Los escasos estudios disponibles hasta el momento habían analizado la parte de la SNG que se introduce en el TGI del RN. Nuestro estudio se centró, por primera vez, en la parte externa de la SNG, el conector (parte que conecta la tubuladura con la SNG) y la tubuladura, es decir, en las partes de estos dispositivos que no están en contacto físico con el RN prematuro. Todas las muestras de alimentos (leche de la propia madre, leche donada y fórmula) recogidas tras su paso por la tubuladura presentaron perfiles microbiológicos muy similares.

El análisis de las superficies internas de la tubuladura y los conectores mediante microscopía electrónica de barrido reveló la formación de complejas biopelículas microbianas cuando tales dispositivos habían estado colocados durante más de 12 horas. Este hecho se puede atribuir a que las SNG se mantienen a una temperatura constante de 37 °C y pueden llegar a estar colocadas en los niños más de 48 h. Es decir, estas biopelículas podrían actuar como un reservorio de patógenos intestinales oportunistas (Hurrell et al., 2009). Además, con el tiempo, se podrían desprender fragmentos de biopelículas envejecidas conteniendo bacterias aglomeradas que, posteriormente, actuarían como un inóculo para el alimento que pasa a través del lumen de la sonda. Esto permitiría una mayor multiplicación bacteriana y la reinoculación del intestino del prematuro con la misma microbiota del ambiente hospitalario. Por lo tanto, no es extraño que la microbiota fecal de los RN prematuros esté dominada frecuentemente por bacterias viables que son habituales en las UCIN, un entorno donde los antibióticos se usan profusamente (Gewolb et al., 1999; LaTuga et al., 2011; Mshvildadze et al., 2010; Schwiertz et al., 2003).

En este estudio, las muestras en las que se encontraron bacterias con mayor frecuencia y en una concentración más alta después de su paso por la tubuladura fueron las correspondientes a la leche de la propia madre. Este es un hallazgo esperado ya que la leche humana ha demostrado ser una fuente natural de bacterias para el intestino del lactante (Fernandez et al., 2013). Además, la leche de la propia madre se administra sin ningún tratamiento después de su recolección o de su almacenamiento en frío, lo cual preserva la

diversidad bacteriana de este fluido biológico (Marin et al., 2009). En contraste, los otros tipos de muestras sí se someten a un tratamiento térmico antes de su administración. Por un lado, las fórmulas infantiles de un solo uso han sido sometidas a un tratamiento de esterilización, mientras que la leche donada se pasteuriza, un tratamiento que destruye todas las formas vegetativas bacterianas y tras el que sólo sobreviven algunas esporas de *Bacillus* spp. (Gómez de Segura et al., 2012). Por lo tanto, el control de la temperatura y la higiene deben ser exquisitos en el manejo de la leche donada tras su pasteurización con el fin de evitar posibles contaminaciones o la germinación de esporas remanentes.

La principal diferencia observada entre la leche de la propia madre y los otros dos tipos de alimento fue la frecuencia de aislamiento y concentración de estafilococos (principalmente *S. epidermidis*), que fueron significativamente mayores en las muestras de leche de la propia madre. Los estafilococos constituyen, al menos cuantitativamente, el primer grupo bacteriano que se encuentra en el microbioma de la leche humana (Hunt et al., 2011; Jost et al., 2013; Ward et al., 2013). Desde hace tiempo, los métodos basados en el cultivo tradicional han revelado que *S. epidermidis* es la especie más frecuente, tanto en la leche humana como en las heces de los lactantes alimentados con leche materna, si bien está prácticamente ausente en los alimentados con fórmula (Jimenez et al., 2008a). Por lo tanto, esta especie puede ser considerada como un rasgo diferencial de la microbiota fecal de los niños alimentados con leche materna. Estudios realizados hace 20 años ya habían descrito que los estafilococos eran comunes en las heces de los lactantes alimentados con leche materna (Balmer y Wharton, 1989; Lundquist et al., 1985; Sakata et al., 1985). Más recientemente, se ha demostrado que los estafilococos coagulasa-negativos colonizan al 100% de los lactantes alimentados con leche materna en países occidentales desde el tercer día de vida (Adlerberth et al., 2006). Estos estafilococos colonizan tanto a los RN nacidos por parto vaginal como a los nacidos por cesárea. Curiosamente, los estafilococos parecen ser las bacterias con mayor capacidad para utilizar los oligosacáridos de la leche humana (Hunt et al., 2012). Por otra parte, los enterococos, como se había observado en ese trabajo, son muy habituales en las heces infantiles, independientemente del tipo de alimentación (Jimenez et al., 2008a).

Con relación a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, tan sólo se pudieron aislar a partir de un bajo porcentaje de las muestras tras su paso por la tubuladura y, en el caso de las bifidobacterias, sólo en el caso de muestras de leche de la propia madre. Estas bacterias también se aíslan o detectan, aunque con menor frecuencia, en la leche humana fresca (Albesharat et al., 2011; Gueimonde et al., 2007; Martin et al., 2003; Martin et al., 2007a; Martin et al., 2009; Perez et al., 2007; Soto et al., 2014). Sin embargo, su prevalencia podría subestimarse tanto cuando se usan técnicas dependientes de cultivo

como cuando se aplican técnicas independientes de cultivo. En el primer caso, su aislamiento es, a menudo, más difícil que el de otras bacterias, mientras que en el segundo, los métodos de extracción de DNA y los cebadores utilizados en la actualidad suelen conducir a la amplificación preferencial de las secuencias de DNA de otros grupos bacterianos (Palmer et al., 2007; Turróni et al., 2012). De todos modos, se ha observado que tanto la concentración como la complejidad de las poblaciones de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son significativamente mayores en los RN amamantados que en los lactantes alimentados con fórmula (Roger et al., 2010). Un estudio reciente ha revelado que la frecuencia de detección de DNA de lactobacilos o bifidobacterias en muestras de leche obtenidas de mujeres que habían recibido antibioterapia durante el embarazo, el parto o la lactancia, fue significativamente menor que la observada en las muestras proporcionadas por mujeres que no habían recibido antibióticos en tales periodos (Soto et al., 2014). En este contexto, hay que tener en cuenta que un porcentaje muy elevado de las mujeres que tienen un PPT suelen recibir antibioterapia.

E. coli, *Klebsiella* spp. y otras enterobacterias, que pueden comportarse tanto como patógenos como comensales, se han detectado ocasionalmente en la leche materna de mujeres sanas (Martin et al., 2007b; Perez et al., 2007), aunque su presencia se suele deber al empleo de bombas extractoras, cuyas superficies suelen estar contaminadas con este tipo de microorganismos. Por otra parte, los estudios moleculares han demostrado que estas bacterias se encuentran entre los primeros colonizadores del intestino infantil, donde pueden coexistir con bacterias Gram-positivas (Favier et al., 2002). En estudios previos también se aisló del interior de las SNG de neonatos *Chronobacter sakazakii*, que es una importante preocupación en las UCIN (Hurrell et al., 2009; Mehall et al., 2002a; Mehall et al., 2002b). Sin embargo, esta especie no se pudo detectar en esta Tesis Doctoral.

A pesar de las diferencias encontradas en la diversidad y las concentraciones bacterianas, se observó un patrón bacteriano común en los tres tipos de alimentos después de su paso por la tubuladura. Como se dijo anteriormente, esto puede reflejar la contaminación entérica de las SNG a nivel del conector y, también, los restos de bacterias presentes en la leche no tratada térmicamente ya que es habitual administrar diferentes tipos de leche a un mismo RN a través de la misma SNG. Por lo tanto, el protocolo de permanencia de la SNG y la tubuladura en los RN prematuros debería ser reconsiderado; de hecho, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral condujeron a un cambio en el protocolo del hospital donde se llevó a cabo la recogida de muestras y, desde entonces, las SNG no permanecen más de 48 h en el RN.

La leche humana contiene una gran cantidad de otros compuestos biológicamente activos, incluyendo agentes antibacterianos, como los anticuerpos maternos, la lactoferrina o la lisozima. Este hecho puede explicar

por qué la leche de la propia madre, a pesar de tener una mayor concentración de bacterias en la tubuladura y en los conectores, también está asociada con un menor número de *Enterobacteriaceae* en las porciones interiores de las SNG en comparación con otros regímenes de alimentación (Hurrell et al., 2009). Este efecto podría contribuir a los efectos beneficiosos para la salud que se asocian con la alimentación con leche materna en prematuros en las UCIN.

Debe señalarse que los perfiles bacterianos descritos en este estudio en el interior de las sondas para la nutrición enteral y en la alimentación de los prematuros después de su paso a través de la tubuladura fueron muy similares a los encontrados en las muestras de heces. La uniformidad en las comunidades bacterianas en los niños prematuros se puede explicar por la gran influencia que tiene el ambiente hospitalario (Schwartz et al., 2003). En las UCIN, el temor a sepsis y otras infecciones determina un uso excesivo de antibióticos, y a una edad muy temprana, en los niños ingresados. Esto, a su vez, incrementa el riesgo de colonización con bacterias predominantes en el ambiente hospitalario, en el que son frecuentes las bacterias resistentes a antibióticos. Es decir, en esta situación se podría crear un círculo vicioso responsable de la reducida diversidad bacteriana observada en las muestras de los neonatos prematuros.

IX. 2. PROPIEDADES BACTERIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E INMUNOLÓGICAS DEL CALOSTRO Y DE LA LECHE MADURA DE MADRES DE NIÑOS EXTREMADAMENTE PREMATUROS

En esta Tesis Doctoral, los géneros bacterianos dominantes entre los aislados que se obtuvieron a partir de las muestras de calostro de mujeres que tuvieron niños prematuros de peso extremadamente bajo al nacer fueron *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*. Estas mismas bacterias también fueron dominantes en las muestras de leche madura, junto con enterococos y enterobacterias. En la última década, como se ha indicado anteriormente, se ha reconocido que la leche humana es una fuente de bacterias, incluyendo los grupos bacterianos citados anteriormente, para el intestino infantil (Fernández et al., 2013). En aquellas muestras en las que se detectó crecimiento bacteriano, los valores de concentración (2-4 log₁₀ UFC/ml) fueron similares a los descritos previamente para el calostro y la leche de mujeres sanas que han tenido un embarazo a término (Perez et al., 2007; Jiménez et al., 2008a; Gómez de Segura et al., 2012). No obstante, sólo se pudieron aislar bacterias a partir de un porcentaje relativamente bajo (<67%) de las muestras analizadas mientras que diversos estudios previos han mostrado que la leche de la inmensa mayoría de las mujeres que han tenido un embarazo a término contiene niveles detectables de bacterias viables (Heikkilä et al., 2003; Martín et al., 2003; Soto et al., 2014).

Esta baja frecuencia de aislamiento bacteriano entre las muestras de calostro y de leche madura de madres de niños extremadamente prematuros puede ser debida a dos razones. En primer lugar, se ha sugerido que al menos una parte de la microbiota intramamaria se origina durante el último tercio del embarazo través de un mecanismo que conlleva complejas interacciones con ciertas células del sistema inmunitario intestinal (Jeurink et al., 2013; Rodríguez et al., 2014); este proceso, que implica una translocación fisiológica de bacterias no patógenas desde el intestino hacia la glándula mamaria parece estar exacerbado durante las últimas semanas de un embarazo a término (Perez et al., 2007). Por lo tanto, la colonización bacteriana de las glándulas mamarias de las madres de prematuros extremos puede no haberse producido o ser mínima y podría ser una de las causas de la baja frecuencia de detección de bacterias en el calostro y la leche de esta población. Algunos estudios (tanto dependientes como independientes de cultivo) han confirmado la transferencia vertical de ciertas bacterias del intestino materno al intestino infantil a través de la leche (Albesharat et al., 2011; Makino et al., 2011; Martín et al., 2012; José et al., 2014). Además, dos estudios en los que se administró tres cepas de lactobacilos aisladas de leche humana por vía oral a mujeres lactantes proporcionaron nuevas evidencias sobre la existencia de dicha forma de transmisión (Jiménez et al., 2008b; Arroyo et al., 2010).

La segunda razón que podría justificar la baja frecuencia de detección de bacterias en las muestras de calostro y leche es que un alto porcentaje de las mujeres participantes recibieron antibioterapia. Recientemente se ha observado que el número de muestras de leche de las que se pueden aislar lactobacilos o bifidobacterias es significativamente menor entre aquellas mujeres que han recibido antibioterapia durante el embarazo o la lactancia (Soto et al., 2014). Es bien sabido que los antibióticos son responsables de procesos de disbiosis en la microbiota humana, que pueden conducir a infecciones oportunistas en los tractos digestivo y/o genitourinario. En los últimos años, se ha puesto de manifiesto que la antibioterapia durante el embarazo, el parto o la lactancia altera la microbiota materna, un hecho que puede tener consecuencias negativas para la salud infantil (Murk et al., 2011). Por otra parte, el uso de antibióticos durante el embarazo se ha asociado a un mayor riesgo de exacerbación del asma infantil (Stensballe et al., 2013).

En esta Tesis Doctoral, el estudio del microbioma de las muestras recogidas habría sido un excelente complemento al análisis dependiente de cultivo, en particular para la detección de bacterias anaerobias estrictas (Jost et al., 2013); sin embargo, la concentración bacteriana de las muestras de leche humana recogidas higiénicamente es típicamente baja ($<10^3$ UFC/ml) y, por lo tanto, se requiere una cantidad relativamente alta de muestra (>5 ml) para obtener una concentración de DNA bacteriano adecuada para el análisis del bacterioma. En este caso, sólo se dispuso de 2 ml de cada muestra

ya que el resto del calostro/leche se utilizó para la alimentación de los respectivos bebés.

La transición de calostro a leche madura se asocia con cambios significativos en la concentración de numerosos compuestos, incluyendo azúcares libres y polioles. Se ha observado en reiteradas ocasiones que las concentraciones de lactosa y glucosa aumentan significativamente tras los primeros días del posparto que sigue a un embarazo a término (Cavalli et al., 2006; Gabrielli et al., 2011; Jóźwik et al., 2013). Los resultados de este trabajo también mostraron que las concentraciones de glucosa y lactosa de la leche madura fueron mayores que las del calostro en la población examinada. Aunque algunos estudios han mostrado que la cantidad de lactosa de la leche pretérmino es generalmente inferior que la de la leche tras un embarazo a término (Cavalli et al., 2006; Coppa et al., 1997), las concentraciones de lactosa existentes en las muestras de calostro y de leche madura analizadas en este estudio fueron similares a las obtenidas a partir de madres de niños nacidos a término (Gómez de Segura et al., 2012, Espinosa-Martos et al., 2013).

En contraste con la lactosa o la glucosa, las concentraciones de mioinositol disminuyen significativamente durante los cuatro primeros días de lactancia (Jóźwik et al., 2013; Espinosa-Martos et al., 2013; Pereira et al., 1990), un hecho que también se ha observado en esta Tesis. El *mio*-inositol es una sustancia que promueve la maduración de varios componentes del surfactante pulmonar y, en consecuencia, puede jugar un papel crítico tanto en la vida fetal como en la neonatal temprana (Howlett et al., 2012). En un estudio pionero, Bromberger y Hallman (1986) encontraron notables diferencias en la concentración de *mio*-inositol dependiendo del alimento (calostro de madres de niños prematuros, calostro de madres de niños nacidos a término, leche madura, fórmulas infantiles, nutrición parenteral). En primer lugar, las muestras de calostro de madres de prematuros contenían concentraciones significativamente más altas de *mio*-inositol que las de aquéllas que dieron a luz a término. Por otra parte, la concentración de *mio*-inositol en calostro fue significativamente mayor que en leche madura en los dos grupos de mujeres mientras que, finalmente, los valores no difirieron significativamente cuando se comparó la leche madura de ambas poblaciones (Bromberger y Hallman, 1986). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo confirman estos hallazgos ya que la concentración media de *mio*-inositol en muestras de calostro (300,59 mg/l) fue significativamente mayor que en las de leche madura (194,27 mg/l). Además, la concentración media en las muestras de calostro proporcionadas por las madres de prematuros extremos que participaron en este estudio fue notablemente superior a la registrada en un trabajo anterior (Espinosa-Martos et al., 2013) cuando se analizaron muestras de calostro de madres de RN a término empleando el mismo procedimiento y la misma tecnología (243,28 mg/l).

La administración de inositol a niños prematuros que padecen síndrome de distrés respiratorio y que reciben nutrición parenteral durante la primera semana de vida está asociada con una mayor supervivencia sin displasia broncopulmonar y con una menor incidencia de la retinopatía del prematuro (Hallman et al., 1986; Hallman et al., 1992). Una revisión Cochrane concluyó que la suplementación con inositol conduce a reducciones estadísticamente significativas en diversos problemas neonatales que se presentan a corto plazo en niños prematuros (Howlett et al., 2012). En este contexto, los resultados de este estudio ponen de relieve la importancia del calostro de la propia madre para los RN prematuros.

En general, las concentraciones de los inmunocompuestos (citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento e inmunoglobulinas) analizados en esta Tesis fueron notablemente mayores en el calostro de las madres de RN extremadamente prematuros que en su leche madura, lo que coincide con los resultados obtenidos previamente por otros autores (Garofalo et al., 2010). Además, las concentraciones de diversos inmunocompuestos (IgA, IL-6, TNF- α , IL-4, IL-17, MCP-1, MIP-1 β , IL-5, IL-7, G-CSF) fueron mayores en las muestras de calostro obtenidas en esta población que en las observadas en las procedentes de mujeres cuyos niños nacieron a término (Espinosa-Martos et al., 2013). La inmunoprotección proporcionada por el calostro y la leche aumenta a medida que disminuye la EG y, en consecuencia, la madurez del neonato (Montagne et al., 1999, Koenig et al., 2005, Castellote et al., 2011). De hecho, el calostro recogido a una EG tan baja (24-27 semanas) puede ser considerado como una leche "preparto", elaborada durante la primera etapa del proceso de lactogénesis. Su peculiar composición se debe a que las uniones entre las células alveolares son más débiles en esa fase del embarazo, lo que permite un estado transitorio de permeabilidad para determinados solutos, incluyendo proteínas de gran tamaño. Así, es probable que la composición específica del calostro en ese período de gestación esté estrechamente relacionada con la propia inmadurez de la glándula mamaria.

Los componentes inmunológicos que son particularmente frecuentes y/o abundantes en el calostro que se produce tras un PPT pueden resultar especialmente protectores durante la primera semana de vida de los niños extremadamente prematuros, una población con un riesgo mucho mayor de padecer intolerancias alimentarias y/o infecciones nosocomiales (Westerbeek et al., 2006; Thompson et al., 2008). Por lo tanto, es muy recomendable que, en estos niños, la alimentación trófica se inicie con el propio calostro de su madre y lo antes posible, ya que es un procedimiento sencillo, económico y bien tolerado incluso por los prematuros más pequeños o más enfermos (Rodríguez et al., 2010).

IX. 3. MODULACIÓN DE LA MICROBIOTA DE LOS NIÑOS PREMATUROS

En esta Tesis, se administraron dos cepas probióticas aisladas de leche humana (*B. breve* PS12929 y *L. salivarius* PS12934) a cinco niños prematuros de peso muy bajo o extremadamente bajo al nacer durante sus primeras semanas de vida y se estudió su efecto sobre la composición bacteriana de las muestras fecales (meconio y heces). Paralelamente, se determinó la concentración de una amplia gama de inmunocompuestos (citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, inmunoglobulinas) en muestras de plasma, meconio y heces con el objetivo de poder determinar si se producían cambios a lo largo del tratamiento y, en tal caso, su posible relación con la colonización bacteriana y/o las características clínicas de los niños.

Los resultados obtenidos indican que la administración de *B. breve* PS12929 y *L. salivarius* PS12934 consiguió aumentar los niveles de lactobacilos y bifidobacterias en las heces de los niños tratados. De hecho, *L. salivarius* PS12934 pudo ser aislado a partir de las muestras desde el séptimo día de la intervención y su presencia se mantuvo constante durante todo el estudio. También se pudo aislar la cepa *B. breve* PS12929 en algunas muestras a partir de los 14 días y, desde entonces, su presencia fue cada vez mayor. El aumento en la frecuencia y concentración de lactobacilos y bifidobacterias en las heces analizadas constituye un resultado muy positivo de la Tesis ya que el patrón de colonización intestinal en esta población específica generalmente se caracteriza por un predominio de patógenos oportunistas y una gran reducción, e incluso ausencia, de lactobacilos y bifidobacterias (Moles et al., 2013; Madan et al., 2012; Mshvildadze et al., 2010). Además, la administración de las dos cepas no sólo conllevó un aumento de las mismas sino que contribuyó a una mayor diversidad bacteriana global en el intestino de los niños tratados. De hecho, los valores de diversidad de sus heces fueron más altos que los descritos previamente en una cohorte similar a la que no se suministró probióticos (Moles et al., 2013). El uso intensivo de antibióticos en las UCIN suele provocar una reducción importante en la diversidad microbiana y un aumento de clones de alto riesgo (Greenwood et al., 2014); sin embargo, la administración de las cepas probióticas en este estudio parecía compensar, al menos parcialmente, estos efectos adversos de los antibióticos.

Hasta la fecha, ha habido una ausencia total de estudios enfocados en los parámetros inmunológicos fecales de los RN prematuros. Como consecuencia, no hay valores de referencia para esta población y, por lo tanto, esta parte de la Tesis puede constituir un punto de partida para futuras investigaciones, a pesar del bajo número de niños evaluados. En contraste, sí existen algunos estudios (aunque muy escasos) centrados en el análisis de diversos compuestos inmunitarios en muestras de sangre de prematuros. Globalmente, los resultados de tales investigaciones demuestran que existen diferencias en los perfiles inmunológicos sanguíneos en función de la EG del niño (Blanco-Quirós et al., 2000; Matoba et al., 2009; Lusyati et al., 2013). En este

sentido, los niveles séricos de IL-8 detectados en RN a término (Hodge et al., 2004) fueron inferiores a los obtenidos en esta Tesis mientras que los de IL-4 e IL-6 fueron similares; sin embargo, los valores para los restantes parámetros inmunológicos fueron siempre más altos en los niños nacidos a término, un hecho que ilustra la inmadurez inmunológica de los prematuros. Del mismo modo, las concentraciones de IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, TNF- α , IFN- γ y MCP-1 fueron más bajas en prematuros nacidos a las 30-32 semanas de gestación que en los nacidos después de 36 semanas, lo que indica una menor estimulación o activación de las células Th1 y de las células presentadoras de antígenos a medida que disminuye la EG del neonato (Lusyati et al., 2013). En esta Tesis, las concentraciones de las quimioquinas IL-8 y MCP-1 y las de las citoquinas IL-4, IL-10 e IL-13, que están relacionadas con los procesos antiinflamatorios, fueron mayores que las descritas anteriormente para neonatos prematuros nacidos a las 30-32 semanas y similares a las halladas en lactantes de mayor edad (> 36 semanas) (Lusyati et al., 2013). Esto sugiere que la administración de las cepas probióticas puede ejercer un efecto modulador sobre el sistema inmune de los niños prematuros.

Es importante tener en cuenta que el volumen de las muestras de sangre que se puede extraer de los prematuros con fines clínicos es, generalmente, muy pequeño. Por lo tanto, es necesario aplicar tecnologías multiplex, como la utilizada en este estudio, para poder analizar simultáneamente un gran número de compuestos inmunitarios (Lusyati et al., 2013; Takahashi et al., 2010). En cualquier caso, los resultados que se han obtenido en esta Tesis deben interpretarse con cautela debido a tres limitaciones importantes: (1) la ausencia de un grupo control; (2) un tamaño muestral muy pequeño; y (3) la gran escasez de estudios previos que se ocupen de las características inmunológicas de los niños nacidos con un peso muy bajo y de cómo se pueden ver afectadas después de un tratamiento con probióticos.

Además, los niños de peso muy bajo o extremadamente bajo al nacer suelen requerir una intervención médica muy individualizada (antibióticos, oxígeno, corticoides, ibuprofeno, transfusiones, etc.) durante, al menos, los primeros días de vida debido a una amplia variedad de problemas potencialmente mortales. Tanto estos problemas, como sus correspondientes tratamientos, pueden alterar el proceso de colonización intestinal y, por ende, las respuestas inmunitarias de los niños. Además, es muy difícil obtener una población homogénea de prematuros con peso muy bajo o extremadamente bajo al nacer. Esta es otra limitación importante a la que los estudios de intervención, incluyendo la administración de probióticos, se deben enfrentar al abordar esta subpoblación infantil.

A pesar de todas las limitaciones citadas anteriormente, en esta Tesis se observó una reducción significativa de la concentración fecal de calprotectina, un importante marcador de inflamación (Rougé et al., 2010; Josefsson et al., 2007; Aydemir et al., 2012), a lo largo del tratamiento

probiótico. Se trata de un resultado prometedor que debe ser confirmado en ensayos futuros en los que se reclute a un número mayor de niños. El aumento de la concentración de IgA observado en el día 7 puede ser debido a una intensificación del proceso de colonización intestinal, lo que desencadena la producción de esta inmunoglobulina por parte del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) (Suzuki et al., 2007). Las moléculas de IgA son capaces de penetrar la superficie de la mucosa intestinal unida a antígenos y, en consecuencia, de inducir respuestas inmunitarias efectoras, jugando un papel clave en el mantenimiento de la microbiota intestinal y la homeostasis inmunológica (Rogosch et al., 2012).

El análisis multivariado aplicado a las muestras de plasma y de heces de los cinco niños reveló una clara relación entre los parámetros evaluados en este trabajo y la evolución clínica de los RN. En el análisis de redundancia (RDA) elaborado con los parámetros fecales, la colonización microbiana actuó como el principal agente opuesto a los niveles de ciertos inmunocompuestos proinflamatorios y en concordancia con las variables clínicas asociadas con una mejora de la salud de los bebés. Puesto que los coeficientes de las especies bacterianas tuvieron valores positivos en el eje RDA1, la calprotectina y otros parámetros proinflamatorios, como IL-8, MIP-1 β , MCP-1, G-CSF, o TNF- α , mostraron valores negativos. Los coeficientes del eje RDA1 para IgG1, IgG2 e IgG4 fueron negativos mientras que los de las inmunoglobulinas secretoras IgA e IgM fueron positivos. Como se ha señalado anteriormente, estos resultados deben tomarse con cautela debido a las limitaciones inherentes a este ensayo clínico y al alto número de interacciones potenciales y factores de confusión; no obstante, sugieren que la administración de las cepas probióticas impide, al menos parcialmente, una colonización microbiana intestinal anormal, que predispone al intestino neonatal a la inflamación y a una cascada de respuestas proinflamatorias y anti-inflamatorias mediadas por citoquinas (Mai et al., 2013). Por otro lado, la evolución de la microbiota de los lactantes fue diferente a la observada en prematuros que no recibieron probioticoterapia (Moles et al., 2013) pero similar a la de aquellos a los que se administraron otras cepas probióticas (Mohan et al., 2006).

Los dendrogramas obtenidos para las muestras y variables representadas en *heatmaps* parecen reforzar la hipótesis de que las cepas probióticas pueden contribuir al desarrollo de una colonización bacteriana normal y que este proceso es esencial para reducir el coste sanitario asociado a la prematuridad (Mai et al., 2011; Siggers et al., 2011). Aunque la cohorte del ensayo fue muy pequeña, la suplementación con las cepas probióticas mostró una influencia claramente prometedora sobre la colonización intestinal, incluyendo un aumento de la diversidad bacteriana, en general, y de la presencia de lactobacilos y bifidobacterias, en particular.

Paralelamente se realizó un estudio microbiómico para determinar el efecto de los probióticos sobre la microbiota de los niños reclutados. Pese al escaso número de muestras que pudieron emplearse en este análisis, se observó un predominio del filo *Proteobacteria* en las muestras de meconio y heces obtenidas previamente a la administración del probiótico, oscilando entre el 69,2 y 89,2% de las lecturas. Tras una semana de tratamiento, se observó un rápido aumento del filo *Firmicutes*, al cual pertenece el género *Lactobacillus*, alcanzando valores comprendidos entre el 33,4 y 73,5% de las lecturas; sin embargo, el filo *Proteobacteria* recuperó su predominancia en las siguientes semanas. A pesar de la variabilidad observada entre niños, las familias predominantes fueron *Lactobacillaceae*, *Staphylococcaceae* y *Enterococcaceae* (filo *Firmicutes*) y *Enterobacteriaceae* y *Moraxellaceae* (filo *Proteobacteria*). Los resultados obtenidos sugieren una relación entre la administración del probiótico, la reducción de enterobacterias y el aumento de la presencia de lactobacilos y bifidobacterias. Sin embargo, la recuperación del filo *Proteobacteria* en la segunda semana de tratamiento, pese a no alcanzar los valores observados en poblaciones similares que no reciben probiótico (Moles et al., 2013), puso nuevamente de manifiesto la enorme influencia del ambiente hospitalario en la colonización del RN prematuro.

Aunque es obvio que se necesitarán ensayos clínicos multicéntricos que impliquen un número mucho más elevado de niños y un mayor tiempo de intervención para determinar la eficacia clínica (prevención de sepsis o NEC, reducción del tiempo de estancia en la UCIN...) de las cepas probióticas, los resultados de este trabajo pueden resultar útiles para futuros estudios relacionados con el empleo de probióticos en niños de peso extremadamente bajo al nacer y, en particular, con la detección y cuantificación de inmunocompuestos en las muestras de heces y sangre obtenidas en esta población.

En los últimos años, se ha constatado que la microbiota intestinal de los niños prematuros presenta ciertas características que la diferencian claramente de la de los nacidos a término. Entre ellas, destacan dos: (a) una menor diversidad, lo que supone la pérdida de funciones metabólicas, inmunológicas y de barrera, que son particularmente relevantes en esa época de la vida; y (b) un dominio abrumador de microorganismos del ámbito hospitalario que, de este modo, tienen fácil acceso a un hospedador particularmente predispuesto a padecer infecciones. En consecuencia, existe un creciente interés en el desarrollo de estrategias que permitan modular el proceso de establecimiento de la microbiota en los neonatos prematuros. Para desarrollar con éxito tales estrategias, resulta fundamental un conocimiento detallado de la microbiota y del microbioma de la pareja madre-hijo y, también, del proceso de establecimiento de la microbiota intestinal en estos niños.

Una de las estrategias podría ser la aplicación de probióticos específicamente seleccionados para dicha población. Es importante señalar que las propiedades probióticas dependen de cada cepa; es decir, cuando se adscribe un efecto probiótico a una cepa, no se puede extrapolar esa propiedad a las restantes cepas de la misma especie. Además, la adscripción de un efecto probiótico de una cepa depende, entre otros factores, de la dosis (típicamente $>10^8$ UFC/ ml o g), forma de administración, sistema de producción y condiciones de almacenamiento.

La administración de probióticos por vía enteral podría jugar un papel relevante en la reducción de la mortalidad y la morbilidad asociada a las infecciones neonatales mediante la prevención de la migración bacteriana a través de las mucosas, la exclusión competitiva de bacterias potencialmente patógenas y la mejora de la respuesta inmunitaria del huésped. Hasta el momento, el número de estudios sobre los efectos de los probióticos en niños prematuros es relativamente bajo pero ha empezado a aumentar rápidamente en los dos últimos años. Todos ellos han demostrado que son seguros, un hecho muy relevante ya que la administración de bacterias vivas a niños que *a priori* están muy inmunodeprimidos, siempre había despertado recelo, preocupación e incluso rechazo; adicionalmente, la mayoría de los estudios ha mostrado que algunas cepas probióticas pueden ser eficaces para la prevención de la NEC y/o de las sepsis en esta población (Chen et al., 2014; Garland et al., 2011; Jacobs et al., 2013; Oncel et al., 2014; Patole et al., 2014; Wang et al., 2012). Todos los meta-análisis publicados recientemente han puesto en evidencia un impacto positivo significativo sobre diversos parámetros clínicos (Janvier et al., 2014). En un meta-análisis, que incluía 24 ensayos, se observó una disminución significativa de la incidencia de NEC y de la mortalidad por cualquier causa (AlFaleh et al., 2011).

Por otra parte, la ingestión de probióticos durante el último trimestre del embarazo tiene un efecto modulador de la microbiota y la secreción de citoquinas en el ecosistema vaginal, hecho que podría tener posibles implicaciones dentro de las estrategias futuras para la prevención del PPT (Vitali et al., 2012). En este mismo sentido, también existen indicios de que la administración de bacterias probióticas a la madre durante el posparto podría contribuir a disminuir la incidencia de NEC en los lactantes alimentados con leche materna (Benor et al., 2014). Recientemente, se ha demostrado que el sobrenadante obtenido a partir del cultivo de una cepa probiótica impide el PPT inducido por LPS y reduce la inflamación en ratonas gestantes (Yang et al., 2014).

Actualmente, el trasplante o transferencia fecal (o "bacterioterapia fecal") ha despertado un gran interés como método para modificar ecosistemas microbianos complejos en situaciones patológicas. Consiste en administrar una suspensión de heces obtenida de una persona sana a otra persona mediante sonda, colonoscopia o enema. Es decir, se transfiere la

microbiota intestinal de una persona a otra, incluyendo no sólo los microorganismos cultivables sino también los que actualmente no se pueden cultivar y que, en consecuencia, no se pueden administrar en forma de un probiótico convencional. Realmente, se trata de un proceso natural que ocurre en la vida temprana, por ejemplo, durante el tránsito por el canal del parto, y que se ha practicado de forma empírica desde hace miles de años. La principal razón para la popularidad de los trasplantes fecales es la eficacia tan elevada que ha mostrado en el tratamiento de ciertas enfermedades muy difíciles de controlar y, especialmente, en la infección recurrente por *Clostridium difficile* (Bakken et al., 2011; Gough et al., 2011; van Nood et al., 2013). Igualmente, se ha descrito el éxito del trasplante fecal para el tratamiento de infecciones infantiles causadas por microorganismos resistentes a los antibióticos (de Vos, 2013).

Sin embargo, el trasplante fecal se enfrenta a problemas prácticos importantes, derivados de la extraordinaria complejidad microbiológica, inmunológica y bioquímica de las heces, cuya composición puede variar incluso dentro de una misma persona, dependiendo de numerosos factores. Por ejemplo, las heces podrían convertirse en fuente de sustancias nocivas o de microorganismos que puedan representar un problema para la salud a medio y largo plazo. Por otro lado, se trata de una muestra biológica que es imposible de estandarizar, lo que limita su aplicación a gran escala. Por lo tanto, existe la necesidad de diseñar y desarrollar nuevos procesos biotecnológicos que permitan aplicar el principio de la transferencia fecal de una forma reproducible.

En este sentido, el concepto de comunidades microbianas mínimas, específicas para un nicho concreto, puede abrir nuevas vías terapéuticas para modificar la microbiota intestinal de personas con diversas patologías (Allen-Vercoe et al., 2012; de Vos, 2013). Recientemente, se ha descrito la eficacia de un sustituto de la microbiota intestinal, elaborado a partir de los cultivos puros de 33 especies bacterianas aisladas de heces de un único donante sano, para tratar casos de infección recurrente por *C. difficile* en los que la antibioterapia había fracasado (Petrof et al., 2013). Este estudio pionero demostró, por primera vez, que una microbiota mínima diseñada en el laboratorio es capaz de curar infecciones resistentes a los antibióticos.

Las ventajas de las comunidades microbianas mínimas son fácilmente perceptibles ya que permiten: (a) controlar la composición de las mezclas de cepas; (2) garantizar la ausencia de sustancias nocivas y patógenos, incluyendo virus; y (c) fabricación a escala industrial y de forma reproducible mediante procesos biotecnológicos. De hecho, la producción aséptica de mezclas de cepas viables (bien liofilizadas o congeladas) en fermentadores industriales es una tecnología bien conocida que se emplea en la producción de cultivos iniciadores o probióticos. La implementación de estas comunidades microbianas sintéticas en terapias de última generación sería de

gran beneficio para los pacientes y, además, permitiría avanzar en nuestra comprensión del microbioma intestinal humano. Serán necesarios muchos estudios para definir las funciones que deben desempeñar los componentes de un microbioma mínimo para la prevención o el tratamiento de las infecciones en los prematuros. En cualquier caso, el desarrollo de comunidades bacterianas definidas, representativas de las que existen en leche humana o en las heces de los lactantes en condiciones fisiológicas, supone un enfoque atractivo para la prevención y el tratamiento de infecciones en la población prematura en el contexto de la creciente aparición de bacterias patógenas multirresistentes.

X. Conclusiones



X. Conclusions

Las conclusiones obtenidas a partir de los resultados de este trabajo de investigación son las siguientes:

Primera. La microbiota gastrointestinal de los niños prematuros posee un marcado carácter individual y muestra importantes fluctuaciones durante las primeras semanas de vida. En general, se caracteriza por (a) una menor diversidad en comparación con la de los niños nacidos a término; (b) un predominio de los microorganismos asociados al ambiente hospitalario; (c) una abundancia de clones de alto riesgo pertenecientes a diversas especies de los géneros *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Serratia*, *Klebsiella* y *Escherichia*; y (d) una escasa presencia de bifidobacterias y lactobacilos.

First. The gastrointestinal microbiota of preterm infants shows a high degree of interindividual variability and sharp fluctuations during the first weeks of life. In general, it is characterized by (a) lower diversity when compared to that of term neonates; (b) dominance of hospital-associated bacteria; (c) abundance of high risk clones belonging to different species of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Serratia*, *Klebsiella* and *Escherichia*; and (d) scarce presence of lactobacilli and bifidobacteria during the period of hospitalization.

Segunda. La microbiota fecal de los niños nacidos prematuramente se normaliza a los 2 años de edad, observándose una disminución significativa en la presencia de clones de alto riesgo que son reemplazados por clones comunitarios sensibles a los antibióticos y sin factores de virulencia.

Second. The fecal microbiota of the infants that were born prematurely becomes normalized when they are 2 year-old. At this age, presence of high risk clones decreased significantly and they were replaced by community clones sensible to antibiotics and lack of virulence factors.

Tercera. Los sistemas de alimentación enteral utilizados en prematuros constituyen un importante foco de proliferación para los microorganismos asociados al ambiente hospitalario, que pueden contaminar el alimento suministrado y colonizar el tracto gastrointestinal infantil.

Third. The enteral feeding systems used to feed preterms constitute an important proliferation loci for hospital-associated microorganisms, which can contaminate the feedings and colonize the preterm gastrointestinal tract.

Cuarta. La composición bioquímica e inmunológica del calostro y la leche de madres de niños prematuros es particularmente adecuada para los requerimientos nutricionales, de crecimiento y desarrollo de esta población.

Fourth. The biochemical and immunological composition of colostrum and milk of women delivering preterm babies is particularly suited for the nutritional, growth and developmental requirements of this infant population.

Quinta. La administración de *Bifidobacterium breve* PS12929 y *Lactobacillus salivarius* PS12934, dos cepas probióticas aisladas de leche humana, parece ser segura y ejercer efectos beneficiosos en la modulación microbiológica e inmunológica de niños prematuros.

Fifth. The administration of *Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934, two probiotic strains isolated from human milk, seems to be safe and exerts beneficial effects on the microbiological and immunological modulation of preterm infants.

XI. Bibliografía



- Aagaard, K., Ma, J., Anthony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J. & Versalovic, J. (2014). The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Science Translational Medicine* 6, 1-11.
- Aarnoudse-Moens, C. S., Weisglas-Kuperus, N., van Goudoever, J. B. & Oosterlaan, J. (2009). Meta-analysis of neurobehavioral outcomes in very preterm and/or very low birth weight children. *Pediatrics*, 124(2), 717-728.
- Abrams, S. A. & Hurst, N. M. (2011). Breastfeeding the preterm infant. *UpToDate*.
www.uptodate.com/contents/breastfeeding-the-preterm-infant.
- Abreu, M. T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: How bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature Reviews Immunology*, 10(2), 131-144.
- Abreu, M. T. & Peek, R. M. (2014). Gastrointestinal malignancy and the microbiome. *Gastroenterology* 146, 1534-1546.
- Adlerberth, I., Lindberg, E., Aberg, N., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegard, I. L., et al. (2006). Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: An effect of hygienic lifestyle? *Pediatric Research*, 59(1), 96-101.
- Adlerberth, I. & Wold, A. E. (2009). Establishment of the gut microbiota in western infants. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, 98(2), 229-238.
- Agostoni, C., Braegger, C., Decsi, T., Kolacek, S., Koletzko, B., Michaelsen, K. F., et al. (2009). Breast-feeding: A commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 49(1), 112-125.
- Agostoni, C., Axelsson, I., Braegger, C., Goulet, O., Koletzko, B., Michaelsen, K. F. et al. (2004). Probiotic bacteria in dietetic products for infants: A commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 38, 365-374.
- Albesharat, R., Ehrmann, M. A., Korakli, M., Yazaji, S. & Vogel, R. F. (2011). Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(2), 148-155.
- Alexander, G. R., Kogan, M., Bader, D., Carlo, W., Allen, M. & Mor, J. (2003). US birth weight/gestational age-specific neonatal mortality: 1995-1997 rates for whites, hispanics, and blacks. *Pediatrics*, 111(1), e61-6.
- Alexander, V. N., Northrup, V. & Bizzarro, M. J. (2011). Antibiotic exposure in the newborn intensive care unit and the risk of necrotizing enterocolitis. *The Journal of Pediatrics* 159, 392-397.
- AlFaleh, K., Anabrees, J., Bassler, D. & Al-Kharfi, T. (2011). Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*, 3(3), CD008991.
- Alfirevic, Z., Stampalija, T., Roberts, D. & Jorgensen, A. L. (2012). Cervical stitch (cerclage) for preventing preterm birth in singleton pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*, 4, CD008991.
- Ali, G. Y., Algohary, E. H., Rashed, K. A., Almoghanum, M. & Khalifa, A. A. (2012). Prevalence of *Candida* colonization in preterm newborns and VLBW in neonatal intensive care unit: Role of maternal colonization as a risk factor in transmission of disease. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 25(6), 789-795.
- Allen-Vercoe, E., Reid, G., Viner, N., Gloor, G. B., Hota, S., Kim, P., et al. (2012). A canadian working group report on fecal microbial therapy: Microbial ecosystems therapeutics. *Canadian Journal of Gastroenterology (Journal*

- Canadien de Gastroenterologie*), 26(7), 457-462.
- Altman, M., Vanpee, M., Cnattingius, S. & Norman, M. (2011). Neonatal morbidity in moderately preterm infants: A swedish national population-based study. *The Journal of Pediatrics*, 158(2), 239-44.
- American Academy of Pediatrics. (2012). Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*, 129(3), e827-41.
- Ananth, C. V., Getahun, D., Peltier, M. R., Salihu, H. M. & Vintzileos, A. M. (2006). Recurrence of spontaneous versus medically indicated preterm birth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 195(3), 643-650.
- Apgar, V. (1953). A Proposal for a'New Method of Evaluation of the Newborn Infant. *Current Researches in Anesthesia and Analgesia*, 260-267.
- Arbolea, S., Sanchez, B., Milani, C., Duranti, S., Sol, G., Fernández, N. et al. (2015). Intestinal Microbiota Development in Preterm Neonates and Effect of Perinatal Antibiotics. *The Journal of Pediatrics* 166, 538-544.
- Arbolea, S., Binetti, A., Salazar, N., Fernández, N., Solís, G., Hernández-Barranco, A., et al. (2012). Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(3), 763-772.
- Ardissone, A. N., de la Cruz, D. M., Davis-Richardson, A. G., Rechcigl, K. T., Li, N., Drew, J. C., et al. (2014). Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. *PloS One*, 9(3), e90784.
- Ahrabi, A. F. & Schanler, R. J. (2013). Human milk is the only milk for premies in the NICU! *Early Human Development* 89, S51-S53.
- Arnold, L. (2002). Using banked donor milk in clinical settings. In: Cadwell K, editor. *Reclaiming Breastfeeding for the United States: Protection, Promotion and Support*. Sudbury, MA: Jones and Bartlett Publishers; pp. 161-178.
- Arrieta, M. C., Stiemsma, L. T., Amenyogbe, N., Brown, E. M. & Finlay, B. (2014). The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Frontiers in Immunology* 5, 427.
- Arroyo, R., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Fernández, L. & Rodríguez, J. M. (2010). Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of lactobacilli isolated from breast milk. *Clinical Infectious Diseases* 50, 1551-1558.
- Arslanoglu, S., Moro, G. E., Ziegler, E. E. & WAPM Working Group on Nutrition. (2010). Optimization of human milk fortification for preterm infants: New concepts and recommendations. *Journal of Perinatal Medicine*, 38(3), 233-238.
- Arslanoglu, S., Corpeleijn, W., Moro, G., Braegger, C., Campoy, C., Colomb, V., et al. (2013). Donor human milk for preterm infants: Current evidence and research directions. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 57(4), 535-542.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., et al. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174-180.
- Arunkumar, A., Jen, R., Butler, A. & Lavoie, P. M. (2012). The developing human preterm neonatal immune system: A case for more research in this area. *Clinical Immunology* 145, 61-68.
- Austin, M. & Leader, L. (2000). Maternal stress and obstetric and infant outcomes: Epidemiological findings and neuroendocrine mechanisms. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 40(3), 331-337.
- Avilés-Jimenez, F., Vazquez-Jimenez, F., Medrano-Guzman, R., Mantilla, A., Torres, J. (2014). Stomach microbiota composition varies between patients with intestinal type of gastric cancer. *Scientific Reports* 4, 4202.
- Aydemir, G., Cekmez, F., Tanju, I. A., Campolat, F. E., Genc, F. A., Yildirim, S. et al. (2012). Increased

- fecal calprotectin in preterm infants with necrotizing enterocolitis. *Clinical Laboratory* 58, 841-844.
- Bacchetta, J., Harambat, J., Dubourg, L., Guy, B., Liutkus, A., Canterino, I., et al. (2009). Both extrauterine and intrauterine growth restriction impair renal function in children born very preterm. *Kidney International*, 76(4), 445-452.
- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P. et al. (2015). Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe* 17 (5), 690-703.
- Badiee, P., Alborzi, A. & Joukar, M. (2011). Molecular assay to detect nosocomial fungal infections in intensive care units. *European Journal of Internal Medicine*, 22(6), 611-615.
- Baibazarova, E., van de Beek, C., Cohen-Kettenis, P. T., Buitelaar, J., Shelton, K. H. & van Goozen, S. H. M. (2013). Influence of prenatal maternal stress, maternal plasma cortisol and cortisol in the amniotic fluid on birth outcomes and child temperament at 3 months. *Psychoneuroendocrinology* 38, 907-915.
- Bakken, J. S., Borody, T., Brandt, L. J., Brill, J. V., Demarco, D. C., Franzos, M. A., et al. (2011). Treating *Clostridium difficile* infection with fecal microbiota transplantation. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 9(12), 1044-1049.
- Ballard, O. & Morrow, A. L. (2013). Human milk composition: Nutrients and bioactive factors. *Pediatric Clinics of North America*, 60(1), 49-74.
- Balmer, S. E. & Wharton, B. A. (1989). Diet and faecal flora in the newborn: Breast milk and infant formula. *Archives of Disease in Childhood*, 64(12), 1672-1677.
- Barrett, E., Kerr, C., Murphy, K., O'Sullivan, O., Ryan, C. A., Dempsey, E. M., et al. (2013). The individual-specific and diverse nature of the preterm infant microbiota. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 98(4), F334-340.
- Barrington, K. J. (2011). Low blood pressure in extremely preterm infants: Does treatment affect outcome? *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 96(5), F316-317.
- Batton, B. J., Li, L., Newman, N. S., Das, A., Watterberg, K. L., Yoder, B. A., et al. (2012). Feasibility study of early blood pressure management in extremely preterm infants. *The Journal of Pediatrics*, 161(1), 65-69.
- Bauer, J. & Gerss, J. (2011). Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants. *Clinical Nutrition* 30, 215-220.
- Bearfield, C., Davenport, E. S., Sivapathasundaram, V. & Allaker, R. P. (2002). Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 109(5), 527-533.
- Beaussart, A., Herman, P., El-Kirat-Chatel, S., Lipke, P. N., Kucharikova, S., Van Dijck, P., et al. (2013). Single-cell force spectroscopy of the medically important *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans* interaction. *Nanoscale*, 5(22), 10894-10900.
- Beck, S., Wojdyla, D., Say, L., Betran, A. P., Merialdi, M., Requejo, J. H., et al. (2010). The worldwide incidence of preterm birth: A systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bulletin of the World Health Organization*, 88(1), 31-38.
- Begega, A., Méndez-López, M., De lscar, M. J., Cuesta-Izquierdo, M., Solís, G., Fernández-Colomer, B., et al. (2010). Assessment of the global intelligence and selective cognitive capacities in preterm 8-year-old children. *Psicothema*, 22(4)
- Bengmark, S. (2013). Gut microbiota, immune development and

- function. *Pharmacological Research* 69, 87-113.
- Bennet, R., Eriksson, M. & Nord, C. (2002). The fecal microflora of 1-3-month-old infants during treatment with eight oral antibiotics. *Infection*, 30(3), 158-160.
- Benor, S., Marom, R., Tov, A. B., Domany, K. A., Zaidenberg-Israeli, G. & Dollberg, S. (2014). Probiotic supplementation in mothers of very low birth weight infants. *American Journal of Perinatology*, 31(6), 497-504.
- Berghella & Society for Maternal-Fetal Medicine Publications Committee. (2012). Progesterone and preterm birth prevention: Translating clinical trials data into clinical practice. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 206(5), 376-386.
- Berrington, J. E., Stewart, C. J., Cummings, S. P. & Embleton, N. D. (2014). The neonatal bowel microbiome in health and infection. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 27(3), 236-243.
- Bhattacharya, S., Raja, E. A., Mirazo, E. R., Campbell, D. M., Lee, A. J., Norman, J. E., et al. (2010). Inherited predisposition to spontaneous preterm delivery. *Obstetrics and Gynecology*, 115(6), 1125-1133.
- Bhutta, Z., Dean, S., Imam, A. & Lassi, Z. (2011). A systematic review of preconception risks and interventions. *Karachi: The Aga Khan University*. Obtenida en Agosto, 2013, de http://mother-childlink.tghn.org/site_media/media/articles/Preconception_Report.pdf.
- Biasucci, G., Rubini, M., Riboni, S., Morelli, L., Bessi, E. & Retetangos, C. (2010). Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Human Development* 86, S13-S15.
- Bik, E. M., Eckburg, P. B., Gill, S. R., Nelson, K. E., Purdom, E. A., Francois, F. et al. (2006). Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *PNAS* 103 (3), 732-737.
- Bin-Nun, A., Bromker, R., Wilschanski, M., Kaplan, M., Rudensky, B., Caplan, M. et al. (2005). Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. *The Journal of Pediatrics* 147, 192-196.
- Blakey, J. L., Lubitz, L., Barnes, G. L., Bishop, R. F., Campbell, N. T. & Gillam, G. L. (1982). Development of gut colonisation in pre-term neonates. *Journal of Medical Microbiology*, 15(4), 519-529.
- Blanco-Quiros, A., Arranz, E., Solis, G., Villar, A., Ramos, A. & Coto, D. (2000). Cord blood interleukin-10 levels are increased in preterm newborns. *European Journal of Pediatrics*, 159(6), 420-423.
- Blaymore, J. A., Oliver, T., Ferguson, A. E. & Vohr, B. R. (2002). Human Milk Improves Cognitive and Motor Development of Premature Infants During Infancy. *Journal of Human Lactation* 18 (4), 361-367.
- Blencowe, H., Cousens, S., Chou, D., Oestergaard, M., Say, L., Moller, A., et al. (2012a). Chapter 2: 15 million preterm births: Priorities for action based on national, regional and global estimates. *Born Too Soon: The Global Action Report on Preterm Birth*. New York: March of Dimes, PMNCH, Save the Children, World Health Organization.
- Blencowe, H., Cousens, S., Oestergaard, M. Z., Chou, D., Moller, A., Narwal, R., et al. (2012b). National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: A systematic analysis and implications. *The Lancet*, 379(9832), 2162-2172.
- Blencowe, H., Lawn, J. E., Vazquez, T., Fielder, A. & Gilbert, C. (2013). Preterm-associated visual impairment and estimates of retinopathy of prematurity at regional and global levels for 2010. *Pediatric Research*, 74(S1), 35-49.
- Bloch, M., Althabe, F., Onyamboko, M., Kaseba-Sata, C., Castilla, E. E., Freire, S., et al. (2008). Tobacco use and secondhand smoke exposure during pregnancy: An investigative survey of women in 9 developing nations. *American Journal of Public Health*, 98(10), 1833-1840.

- Blondel, B., Macfarlane, A., Gissler, M., Breart, G. & Zeitlin, J. (2006). General obstetrics: Preterm birth and multiple pregnancy in european countries participating in the PERISTAT project. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 113(5), 528-535.
- Blondel, B. & Kaminski, M. (2002). Trends in the occurrence, determinants, and consequences of multiple births. *Seminars in Perinatology*, 26(4), 239-249.
- Bloom, S. L., Yost, N. P., McIntire, D. D. & Leveno, K. J. (2001). Recurrence of preterm birth in singleton and twin pregnancies. *Obstetrics and Gynecology*, 98(3), 379-385.
- Bocca-Tjeertes, I. F., Kerstjens, J. M., Reijneveld, S. A., de Winter, A. F. & Bos, A. F. (2011). Growth and predictors of growth restraint in moderately preterm children aged 0 to 4 years. *Pediatrics*, 128(5), e1187-94.
- Bolton, C. E., Stocks, J., Hennessy, E., Cockcroft, J. R., Fawke, J., Lum, S., et al. (2012). The EPICure study: Association between hemodynamics and lung function at 11 years after extremely preterm birth. *The Journal of Pediatrics*, 161(4), 595-601.
- Bonsante, F., Iacobelli, S., Gouyon, J. B. (2013). Routine probiotic use in very preterm infants: retrospective comparison of two cohorts. *American Journal of Perinatology* 30 (1), 41-46.
- Borrue, N. (2003). Interacciones bacterianas con el sistema inmunológico intestinal: Inmunomodulación. *Gastroenterología y Hepatología*, 26(1), 13-22.
- Bonsante, F., Iacobelli, S. & Gouyon, J. B. (2013). Routine probiotic use in very preterm infants: retrospective comparison of two cohorts. *American Journal of Perinatology* 30 (1), 41-46.
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. R. et al. (2009). Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An update from the infectious diseases society of America. *Clinical Infectious Diseases* 48, 1-12.
- Boyd, C. A., Quigley, M. A. & Brocklehurst, P. (2007). Donor breast milk versus infant formula for preterm infants: Systematic review and meta-analysis. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 92(3), F169-75.
- Boyle, E. M., Poulsen, G., Field, D. J., Kurinczuk, J. J., Wolke, D., Alfirevic, Z., et al. (2012). Effects of gestational age at birth on health outcomes at 3 and 5 years of age: Population based cohort study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 344, e896.
- Bracewell, M. A., Hennessy, E. M., Wolke, D. & Marlow, N. (2008). The EPICure study: Growth and blood pressure at 6 years of age following extremely preterm birth. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 93(2), F108-14.
- Braga, T. D., da Silva, G. A., de Lira, P. I. et al. (2011). Efficacy of *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus casei* oral supplementation on necrotizing enterocolitis in very-low-birth-weight preterm infants: a double-blind, randomized, controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 93, 81-86.
- Brandtzaeg, P. (2010). The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *The Journal of Pediatrics*, 156(Suppl 2), S8-15.
- Bromberger, P. & Hallman, M. (1986). Myoinositol in small preterm infants: Relationship between intake and serum concentration. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 5(3), 455-458.
- Brunner, B., Hoeck, M., Schermer, E., Streif, W. & Kiechl-Kohlendorfer, U. (2012). Patent ductus arteriosus, low platelets, cyclooxygenase inhibitors, and intraventricular hemorrhage in Very Low Birth Weight preterm infants. *The Journal of Pediatrics* 163 (1), 23-28.
- Brunkhorst, J., Weiner, J. & Lantos, J. (2014). Infants of borderline viability: The ethics of delivery room

- care. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. Article in press.
- Buddington, R. K., Williams, C. H., Kostek, B. M., Buddington, K. K. & Kullen, M. J. (2010). Maternal-to-infant transmission of probiotics: Concept validation in mice, rats, and pigs. *Neonatology*, 97(3), 250-256.
- Bustos, G. (2008). Alimentación enteral del recién nacido pretérmino. *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de la AEP: neonatología*. Asociación Española de Pediatría y Sociedad Española de Neonatología. Madrid: AEP, 58-67.
- Butel, M. J., Suau, A., Campeotto, F., Magne, F., Aires, J., Ferraris, L., et al. (2007). Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: A prospective analysis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 44(5), 577-582.
- Cabañas, F. & Pellicer, A. (2008). Lesión cerebral en el niño prematuro. *Protocolos Diagnóstico Terapéuticos de la AEP: Neonatología*.
- Camargo, A. M. & Bernis, C. (2013). Variación temporal de los resultados del embarazo en España (1980-2007) según el lugar de nacimiento. *Antropo* 29, 109-123.
- Campeotto, F., Suau, A., Kapel, N., Magne, F., Viallon, V., Ferraris, L., et al. (2011). A fermented formula in pre-term infants: Clinical tolerance, gut microbiota, down-regulation of faecal calprotectin and up-regulation of faecal secretory IgA. *British Journal of Nutrition*, 105(12), 1843-1851.
- Cario, E. (2005). Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut*, 54(8), 1182-1193.
- Carlini, L., Somigliana, E., Rossi, G., Veglia, F., Busacca, M. & Vignali, M. (2012). Risk factors for spontaneous preterm birth: A Northern Italian multicenter case-control study. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 53, 174-180.
- Carlisle, E. M. & Morowitz, M. J. (2013). The intestinal microbiome and necrotizing enterocolitis. *Current Opinion in Pediatrics*, 25(3), 382-387.
- Carmody, J. B. & Charlton, J. R. (2013). Short-term gestation, long-term risk: Prematurity and chronic kidney disease. *Pediatrics*, 131(6), 1168-1179.
- Castellote, C., Casillas, R., Ramirez-Santana, C., Perez-Cano, F. J., Castell, M., Moretones, M. G., et al. (2011). Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *The Journal of Nutrition*, 141(6), 1181-1187.
- Cattaneo, A., Davanzo, R., Uxa, F. & Tamburlini, G. (1998). Recommendations for the implementation of kangaroo mother care for low birthweight infants. *Acta Paediatrica*, 87(4), 440-445.
- Cavalli, C., Teng, C., Battaglia, F. C. & Bevilacqua, G. (2006). Free sugar and sugar alcohol concentrations in human breast milk. *The Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 42, 215-221.
- Cedergren, M. I. (2004). Maternal morbid obesity and the risk of adverse pregnancy outcome. *Obstetrics & Gynecology* 103 (2), 219-224.
- Challis, J. R. & Smith, S. K. (2001). Fetal endocrine signals and preterm labor. *Biology of the Neonate*, 79(3-4), 163-167.
- Chang, H. H., Larson, J., Blencowe, H., Spong, C. Y., Howson, C. P., Cairns-Smith, S., et al. (2013). Preventing preterm births: Analysis of trends and potential reductions with interventions in 39 countries with very high human development index. *The Lancet*, 381(9862), 223-234.
- Chang, J. Y., Shin, S. M., Chun, J., Lee, J. H. & Seo, J. K. (2011). Pyrosequencing-based molecular monitoring of the intestinal bacterial colonization in preterm infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 53(5), 512-519.

- Chassard, C., de Wouters, T. & Lacroix, C. (2014). Probiotics tailored to the infant: a window of opportunity. *Current Opinion in Biotechnology* 26, 141-147.
- Chauhan, M., Henderson, G. & McGuire, W. (2008). Enteral feeding for very low birth weight infants: Reducing the risk of necrotizing enterocolitis. *Archives of Disease in Childhood.Fetal and Neonatal Edition*, 93(2), F162-6.
- Chen, A. C., Chung, M. Y., Chang, J. H. & Lin, H. C. (2014). Pathogenesis implication for necrotizing enterocolitis prevention in preterm very-low-birth-weight infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 58(1), 7-11.
- Chen, C. C. & Walker, W. A. (2013). Probiotics and the mechanism of necrotizing enterocolitis. *Seminars in Pediatric Surgery* 22, 94-100.
- Chervenak, F. A. & McCullough, L. B. (2013). Ethical issues in periviable birth. *Seminars in Perinatology* 37, 422-425.
- Chou, I. C., Kuo, H. T., Chang, J. S., Wu, S. F., Chiu, H. Y., Su, B. H. et al. (2010). Lack of effects of oral probiotics on growth and neurodevelopmental outcomes in preterm Very Low Birth Weight infants. *The journal of Pediatrics* 156, 393-396.
- Christianson, A., Howson, C. & Modell, B. (2006). March of dimes global report on birth defects: The hidden toll of dying and disabled children. *New York: March of Dimes Birth Defects Foundation*. White Plains, New York, USA.
- Chrzanowska-Liszewska, D., Seliga-Siwecka, J. & Kornacka, M. K. (2012). The effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG supplemented enteral feeding on the microbiotic flora of preterm infants-double blinded randomized control trial. *Early Human Development* 88, 57-60.
- Cilieborg, M. S., Boye, M. & Sangild, P. T. (2012). Bacterial colonization and gut development in preterm neonates. *Early Human Development*, 88, S41-S49.
- Cilleruelo, M. L. & Calvo, C. (2004). Fórmulas adaptadas para lactantes y modificaciones actuales de éstas. *Anales de Pediatría Continuada* 2 (6), 325-338.
- Claud, E. C. (2011). Probiotics and neonatal necrotizing enterocolitis. *Anaerobe* 17 (4), 180-185.
- Claud, E. C. & Walker, W. A. (2001). Hypothesis: Inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(8), 1398-1403.
- Clemente, J. C., Pehrsson, E. C., Blaser, M. J., Sandhu, K., Gao, Z. & Wang, B. (2015). The microbiome of uncontacted Amerindians. *Science Advances* 1, e1500183.
- Cnattingius, S. (2004). The epidemiology of smoking during pregnancy: Smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes. *Nicotine & Tobacco Research: Official Journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco*, 6 (Suppl 2), S125-140.
- Coker, A. L., Sanderson, M. & Dong, B. (2004). Partner violence during pregnancy and risk of adverse pregnancy outcomes. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 18(4), 260-269.
- Collado, M. C., Cernada, M., Baüerl, C., Vento, M. & Pérez-Martínez, G. (2012). Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. *Gut Microbes* 3, 352-365.
- Collins, S. M., Surette, M. & Bercik, P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nature Reviews Microbiology*, 10(11), 735-742.
- Conde-Agudelo, A., Rosas-Bermudez, A. & Kafury-Goeta, A. C. (2006). Birth spacing and risk of adverse perinatal outcomes: A meta-analysis. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 295(15), 1809-1823.

- Coppa, G. V., Pierani, P., Zampini, L., Gabrielli, A., Carlucci, A., Catassi, C. et al. (1997). Lactose, oligosaccharide and monosaccharide content of milk from mothers delivering preterm newborns over the first month of lactation. *Minerva Pediatric* 49, 471-475.
- Costalos, C., Skouteri, V., Gounaris, A. et al. (2003). Enteral feeding of premature infants with *Saccharomyces boulardii*. *Early Human Development*, 74, 89-96.
- Costello, E. K., Carlisle, E. M., Bik, E. M., Morowitz, M. J. & Relman, D. A. (2013). Microbiome assembly across multiple body sites in low-birth weight infants. *MBio* 4, e00782-13.
- Costello, E. K., Lauber, C. L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J. I. & Knight, R. (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 326, 1694-1647
- Costeloe, K., Hennessy, E., Gibson, A. T., Marlow, N. & Wilkinson, A. R. (2000). The EPICure study: Outcomes to discharge from hospital for infants born at the threshold of viability. *Pediatrics*, 106(4), 659-671.
- Crider, K. S., Whitehead, N. & Buus, R. M. (2005). Genetic variation associated with preterm birth: A Huge review. *Genetics in Medicine* 7 (9), 593-604.
- Cronin, C. M., Shapiro, C. R., Casiro, O. G. & Cheang, M. S. (1995). The impact of very low-birth-weight infants on the family is long lasting. A matched control study. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 149(2), 151-158.
- Dadvand, P., Basagaña, X., Sartini, C., Figueras, F., Vrijheid, M., de Nazalle, A. et al. (2011). Climate Extremes and the Length of Gestation. *Environmental Health Perspectives* 119 (10), 1449-1453.
- Dani, C., Biadaioli, R., Bertini, G. et al. (2002). Probiotics feeding in prevention of urinary tract infection, bacterial sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants: A prospective double-blind study. *Biology of the Neonate* 82, 103-108.
- Dasanayake, A. P., Li, Y., Wiener, H., Ruby, J. D. & Lee, M. J. (2005). Salivary *Actinomyces naeslundii* genospecies 2 and *Lactobacillus casei* levels predict pregnancy outcomes. *Journal of Periodontology*, 76(2), 171-177.
- David, L. A., Materna, A. C., Friedman, J., Campos-Baptista, M. I., Blackburn, M. C., Perrotta, A. et al. (2014). Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome Biology* 15, R89.
- Davis, L., Edwards, H., Mohay, H. & Wollin, J. (2003). The impact of very premature birth on the psychological health of mothers. *Early Human Development*, 73(1), 61-70.
- de Jong, M., Verhoeven, M. & van Baar, A. L. (2012). School outcome, cognitive functioning, and behaviour problems in moderate and late preterm children and adults: A review. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 17(3), 163-169.
- De la Cochetière, M. F., Piloquet, H., Des Robert, C., Darmaun, D., Galmiche, J. P. & Rozé, J. C. (2004). Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis in premature infants: The putative role of *Clostridium*. *Pediatric Research* 56, 366-370.
- De Man, P., Verhoeven, B., Verbrugh, H., Vos, M. & Van Den Anker, J. (2000). An antibiotic policy to prevent emergence of resistant bacilli. *The Lancet*, 355(9208), 973-978.
- de Vos, W. M. (2013). Fame and future of faecal transplants-developing next-generation therapies with synthetic microbiomes. *Microbial Biotechnology*, 6(4), 316-325.
- de Weerth, C., Fuentes, S. & de Vos, W. M. (2013). Crying in infants: On the possible role of intestinal microbiota in the development of colic. *Gut Microbes*, 4(5), 416-421.
- Dean, S. V., Mason, E. M., Howson, C. P., Lassi, Z. S., Imam, A. M. & Bhutta, Z. A. (2013). Born too soon: Care

- before and between pregnancy to prevent preterm births: From evidence to action. *Reproductive Health*, 10(Suppl 1), S3.
- Delgado, S., Suárez, A. & Mayo, B. (2011). Identification, typing and characterisation of *Propionibacterium* strains from healthy mucosa of the human stomach. *International Journal of Food Microbiology* 149 (1): 65-72.
- Deshpande, G. C., Rao, S. C., Keil, A. D. & Patole, S. K. (2011). Evidence-based guidelines for use of probiotics in preterm neonates. *BMC Medicine* 9, 92.
- Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M. & Relman, D. A. (2007). An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature* 449, 811-818.
- Di Mauro, A., Neu, J., Riezzo, G., Raimondi, F., Martinelli, D., Francavilla, R., et al. (2013). Gastrointestinal function development and microbiota. *Italian Journal of Pediatrics*, 39(15), 1-7.
- Di Natale, C., Coclite, E., Di Ventura, L. & Di Fabio, S. (2011). Fortification of maternal milk for preterm infants. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 24(S1), 41-43.
- Dial, M. S. (2009). Proton pump inhibitor use and enteric infections. *The American Journal of Gastroenterology*, 104 Suppl 2, S10-6.
- Díaz, J. J. (2015). Aplicaciones en Gastroenterología. *Nutrición Hospitalaria* 31(S1), 21-25.
- DiBiasie, A. (2006). Evidence-based review of retinopathy of prematurity prevention in VLBW and ELBW infants. *Neonatal Network: The Journal of Neonatal Nursing*, 25(6), 393-403.
- Dicksved, J., Lindberg, M., Rosenquist, M., Enroth, H., Jansson, J. K. & Engstrand, L. (2009). Molecular characterization of the stomach microbiota in patients with gastric cancer and in controls. *Journal of Medical Microbiology* 58, 509-516.
- DiGiulio, D. B., Romero, R., Amogan, H. P., Kusanovic, J. P., Bik, E. M., Gotsch, F., et al. (2008). Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: A molecular and culture-based investigation. *PLoS One*, 3(8), e3056.
- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N. et al. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *PNAS* 107, 11971-11975.
- Dominguez-Bello, M. G. & Blaser, M. J. (2008). Do you have a probiotic in your future? *Microbes and Infection* 10 (9), 1072-1076.
- Donovan, S. M. (2006). Role of human milk components in gastrointestinal development: Current knowledge and future. *The Journal of Pediatrics*, 149(5) S49-S61.
- Doré, J. & Corthier, G. (2010). The human intestinal microbiota. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 34 (S1), S7-S15.
- Drazin, P. B. (1998). Contamination in Expressed Breast Milk. *Journal of Human Lactation* 14, 100.
- Dunkel-Schetter, C. (1998). Maternal stress and preterm delivery. *Prenatal and Neonatal Medicine*, 3, 39-42.
- Dupont-Thibodeau, A., Barrington, K. J., Farlow, B. & Janvier, A. (2014). End-of-life decisions for extremely low-gestational-age infants: Why simple rules for complicated decisions should be avoided. *Seminars in Perinatology* 38, 31-37.
- Dvorak, B., Fituch, C. C., Williams, C. S., Hurst, N. M. & Schanler, R. J. (2003). Increased epidermal growth factor levels in human milk of mothers with extremely premature infants. *Pediatric Research*, 54(1), 15-19.
- Echarri, P. P., Martínez, C., Ros, G., Vives, I., Ballesta, M., Solís, G. et al. (2011). Assessment of intestinal microbiota of full-term breast-fed infants from two different geographical locations. *Early Human Development* 87, 511-513.
- Edmond, K. & Bahl, R. (2008). Optimal feeding of low-birth-weight infants. *Geneva, Switzerland: World Health Organization*, 2006.

- Edwards, C. A. & Parrett, A. M. (2002). Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *British Journal of Nutrition* 88 (S1), S11-S18.
- EFCNI. (2011). *European Foundation for the Care of Newborn Infants*. Obtenida en Septiembre, 2014, de <http://www.efcni.org/>
- EFSA. (2013 update). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed. *EFSA Journal* 11, 3449.
- Ehrenkranz, R. A. (2010). Early nutritional support and outcomes in ELBW infants. *Early Human Development*, 86 (Suppl 1), 21-25.
- Eichenwald, E. C. & Stark, A. R. (2008). Management and outcomes of very low birth weight. *The New England Journal of Medicine*, 358(16), 1700-1711.
- Eidelman, A. I. (2012). Breastfeeding and the use of human milk: An analysis of the American Academy of Pediatrics, breastfeeding policy statement. *Breastfeeding Medicine*, 7(5), 323-324.
- Eisengart, S. P., Singer, L. T., Fulton, S. & Baley, J. E. (2003). Coping and psychological distress in mothers of very low birth weight young children. *Parenting: Science and Practice*, 3(1), 49-72.
- El Aidy, S., Dinan, T. G. & Cryan, J. F. (2015). Gut Microbiota: The conductor in the orchestra of immune-neuroendocrine communication. *Clinical Therapeutics*. Article in press.
- El Aidy, S., Hooiveld, G., Tremaroli, V., Backhed, F. & Kleerebezem, M. (2013). The gut microbiota and mucosal homeostasis: Colonized at birth or at adulthood, does it matter? *Gut Microbes*, 4(2), 118-124.
- Elgen, S. K., Leversen, K. T., Grundt, J. H., Hurum, J., Sundby, A. B., Elgen, I. B., et al. (2012). Mental health at 5 years among children born extremely preterm: A national population-based study. *European Child & Adolescent Psychiatry*, 21(10), 583-589.
- Elsinga, J., de Jong-Potjer, L. C., van der Pal-de Bruin, Karin M, le Cessie, S., Assendelft, W. J. & Buitendijk, S. E. (2008). The effect of preconception counselling on lifestyle and other behaviour before and during pregnancy. *Women's Health Issues*, 18(6), S117-S125.
- Embleton, N. E., Pang, N. & Cooke, R. J. (2001). Postnatal malnutrition and growth retardation: An inevitable consequence of current recommendations in preterm infants? *Pediatrics*, 107(2), 270-273.
- Engel, S. A. M., Erichsen, H. C., Savitz, D. A., Thorp, J., Chanock, S. J. & Olshan, A. F. (2005). Risk of spontaneous preterm birth is associated with common proinflammatory cytokine polymorphisms. *Epidemiology* 16 (4), 469-477.
- Engstrand, L. & Lindberg, M. (2013). Helicobacter pylori and the gastric microbiota. *Best Practice Research: Clinical Gastroenterology* 27, 39-45.
- Escobar, G. J., Clark, R. H. & Greene, J. D. (2006). Short-term outcomes of infants born at 35 and 36 weeks gestation: We need to ask more questions. *Seminars in Perinatology*, 30(1), 28-33.
- Escuder-Vieco, D., Garcia-Algar, Ó, Pichini, S., Pacifici, R., García-Lara, N. R. & Pallás-Alonso, C. R. (2013). Validation of a screening questionnaire for a human milk bank to determine the presence of illegal drugs, nicotine, and caffeine. *The Journal of Pediatrics*, 164(4), 811-814.
- Espinosa-Martos, I., Montilla, A., de Segura, A. G., Escuder, D., Bustos, G., Pallas, C., et al. (2013). Bacteriological, biochemical, and immunological modifications in human colostrum after holder pasteurisation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 56(5), 560-568.
- Esplin, M. S., O'Brien, E., Fraser, A., Kerber, R. A., Clark, E., Simonsen, S. E., et al. (2008). Estimating recurrence of spontaneous

- preterm delivery. *Obstetrics and Gynecology*, 112(3), 516-523.
- European Centre for Disease and Control. (2012). *Measles and rubella monitoring*. Obtenida el 4 de diciembre de 2014, de <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/measles-rubella-monthly-surveillance-dec-2012.pdf>
- Ewer, A. & Yu, V. (1996). Gastric emptying in preterm infants: The effect of breast milk fortifier. *Acta Paediatrica*, 85(9), 1112-1115.
- Faith, J. J., Guruge, J. L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A. L. et al. (2013). The long-term stability of the human gut microbiota. *Science* 341, 1237439.
- Fanaro, S. (2013). Feeding intolerance in the preterm infant. *Early Human Development* 89, S13-S20.
- Fanaro, S. (2010). Which is the ideal target for preterm growth? *Minerva Pediatrica*, 62(3 Suppl 1), 77-82.
- Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P. & Vigi, V. (2003). Intestinal microflora in early infancy: Composition and development. *Acta Paediatrica*, 91(441), 48-55.
- Fanaroff, A. A., Stoll, B. J., Wright, L. L., Carlo, W. A., Ehrenkranz, R. A., Stark, A. R., et al. (2007). Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 196(2), 147.e1-147.e8.
- Farrell, P. M. & Wood, R. E. (1976). Epidemiology of hyaline membrane disease in the United States: Analysis of national mortality statistics. *Pediatrics*, 58(2), 167-176.
- Favier, C. F., Vaughan, E. E., De Vos, W. M. & Akkermans, A. D. (2002). Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 219-226.
- Favre, A., Szylił, O., Popot, F., Catala, I., Rondeau, C., Maurage, C., et al. (2002). Diet, length of gestation, and fecal short chain fatty acids in healthy premature neonates. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 26(1), 51-56.
- Fawke, J., Lum, S., Kirkby, J., Hennessy, E., Marlow, N., Rowell, V., et al. (2010). Lung function and respiratory symptoms at 11 years in children born extremely preterm: The EPICure study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 182(2), 237-245.
- Fawke, J. (2007). Neurological outcomes following preterm birth. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 12, 374-382.
- Felberbaum, R. E. (2007). Multiple pregnancies after assisted reproduction-international comparison. *Reproductive Biomedicine Online*, 15(Suppl 3), 53-60.
- Feldman, R., Rosenthal, Z. & Eidelman, A. I. (2014). Maternal-Preterm Skin-to-Skin Contact Enhances Child Physiologic Organization and Cognitive Control Across the First 10 Years of Life. *Biological Psychiatry* 75, 56-64.
- Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R., et al. (2013). The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 69(1), 1-10.
- Ferraris, L., Butel, M. J., Campeotto, F., Vodovar, M., Roze, J. C. & Aires, J. (2012). Clostridia in premature neonates' gut: Incidence, antibiotic susceptibility and perinatal determinants influencing colonization. *PLoS One*, 7(1), e30594.
- Fichorova, R. N., Onderdonk, A. B., Yamamoto, H., Delaney, M. L., DuBois, A. M., Allred, E., et al. (2011). Maternal microbe-specific modulation of inflammatory response in extremely low-gestational-age newborns. *mBio*, 2(1), e00280-10.
- Fidler, N., Sauerwald, T. U., Koletzko, B. & Demmelmaier, H. (1998). Effects of human milk pasteurization and sterilization on available fat content and fatty acid

- composition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 27(3), 317-322.
- Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *WHO 2001*.
- Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. (2002). Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. *FAO 2002*.
- Fouhy, F., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. & Cotter, P. D. (2012). Composition of the early intestinal microbiota: Knowledge, knowledge gaps and the use of high-throughput sequencing to address these gaps. *Gut Microbes*, 3(3), 203-220.
- Franks, A. H., Harmsen, H. J. M., Raangs, G. C., JANSEN, G. J., Schut, F. & Welling, G. W. (1998). Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-Targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3336-3345.
- Fukushima, A., Kawahara, H., Isurugi, C., Syoji, T., Oyama, R. Sugiyama, T. et al. (2005). Changes in serum levels of heat shock protein 70 in preterm delivery and pre-eclampsia. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 31 (1), 72-77.
- Funkhouser, L. J. & Bordenstein, S. R. (2013). Mom knows best: The universality of maternal microbial transmission. *PLoS Biology*, 11(8), e1001631.
- Gabrielli, O., Zampini, L., Galeazzi, T., Padella, L., Santoro, L., Peila, C. et al. (2011). Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. *Pediatrics* 128, e1520-31.
- Gantert, M., Been, J., Gavilanes, A., Garnier, Y., Zimmermann, L. & Kramer, B. (2010). Chorioamnionitis: A multiorgan disease of the fetus & quest. *Journal of Perinatology*, 30, S21-S30.
- García-Lara, N., García-Algar, O. & Alonso, C. R. P. (2012). Sobre bancos de leche humana y lactancia materna. *Anales de Pediatría: Publicación Oficial de la Asociación Española de Pediatría (AEP)*, 76(5), 247-249.
- Garland, S. M., Tobin, J. M., Pirotta, M., Tabrizi, S. N., Opie, G., Donath, S., et al. (2011). The ProPrems trial: Investigating the effects of probiotics on late onset sepsis in very preterm infants. *BMC Infectious Diseases*, 11, 210-2334-11-210.
- Garofalo, R. (2010). Cytokines in human milk. *The Journal of Pediatrics*, 156(Suppl 2), S36-40.
- Gavard, J. A. & Artal, R. (2008). Effect of exercise on pregnancy outcome. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 51(2), 467-480.
- Geddes, D., Hartmann, P. & Jones, E. (2013). Preterm birth: Strategies for establishing adequate milk production and successful lactation. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 18, 155-159.
- Gewolb, I. H., Schwalbe, R. S., Taciak, V. L., Harrison, T. S. & Panigrahi, P. (1999). Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 80(3), F167-73.
- Gibbins, S., Wong, S. E., Unger, S. & O'Connor, D. (2013). Donor human milk for preterm infants: Practice considerations. *Journal of Neonatal Nursing* 19, 175-181.
- Gibson, A. T. (2007). Outcome following preterm birth. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 21 (5), 869-882.
- Gianni, M. L., Roggero, P., Piemontese, P., Orsi, A., Amato, O., Taroni, F., et al. (2012). Body composition in newborn infants: 5-year experience in an italian neonatal intensive care unit. *Early Human Development*, 88 (Suppl 1), S13-7.
- Gill, S. R., Pop, M., DeBoy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S. et al. (2006). Metagenomic

- analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312, 1355-1359.
- Goldenberg, R. L. & Culhane, J. F. (2006). Preterm birth and periodontal disease. *The New England Journal of Medicine* 355 (18), 1925-1927.
- Goldenberg, R. L., Culhane, J. F., Iams, J. D. & Romero, R. (2008). Epidemiology and causes of preterm birth. *The Lancet*, 371(9606), 75-84.
- Goldenberg, R. L., Gravett, M. G., Iams, J., Papageorgiou, A. T., Waller, S. A., Kramer, M., et al. (2012). The preterm birth syndrome: Issues to consider in creating a classification system. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 206(2), 113-118.
- Gómez de Segura, A., Escuder, D., Montilla, A., Bustos, G., Pallas, C., Fernandez, L., et al. (2012). Heating-induced bacteriological and biochemical modifications in human donor milk after holder pasteurisation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 54(2), 197-203.
- Gonçalves, L. F., Chaiworapongsa, T. & Romero, R. (2002). Intrauterine infection and prematurity. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 8, 3-13.
- Gosalbes, M. J., Llop, S., Valles, Y., Moya, A., Ballester, F. & Francino, M. P. (2013). Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 43(2), 198-211.
- Gough, E., Shaikh, H. & Manges, A. R. (2011). Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 53(10), 994-1002.
- Gouyon, J. B., Iacobelli, S., Ferdynus, C. & Bonsante, F. (2012). Neonatal problems of late and moderate preterm infants. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 17, 146-152.
- Goya, M., Pratcorona, L., Merced, C., Rodó, C., Valle, L., Romero, A., et al. (2012). Cervical pessary in pregnant women with a short cervix (PECEP): An open-label randomised controlled trial. *The Lancet*, 379(9828), 1800-1806.
- Gravett, M. G., Rubens, C. E. & Nunes, T. M. (2010). Global report on preterm birth and stillbirth (2 of 7): Discovery science. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 10(Suppl 1), S2.
- Greenwood, C., Morrow, A. L., Lagomarcino, A. J., Altaye, M., Taft, D. H., Yu, Z. et al. (2014). Early empiric antibiotic use in preterm infants is associated with lower bacterial diversity and higher relative abundance of *Enterobacter*. *The Journal of Pediatrics* 165 (1), 23-29.
- Grzona, M. E. (2006). Prematuros extremos ¿Es posible establecer un límite de viabilidad? *Acta Bioética* 12 (1), 101-111.
- Guarner, F., Requena, T. & Marcos, A. (2010). Consensus statements from the Workshop "Probiotics and Health: Scientific evidence". *Nutrición hospitalaria* 25, 700-704.
- Guarner, F. & Malagelada, J. R. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361(9356), 512-519.
- Gueimonde, M., Laitinen, K., Salminen, S. & Isolauri, E. (2007). Breast milk: A source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology*, 92(1), 64-66.
- Gyamfi-Bannerman, C., Fuchs, K. M., Young, O. M. & Hoffman, M. K. (2011). Non spontaneous late preterm birth: Etiology and outcomes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 205(5), 456.e1-456.e6.
- Hack, M., Schluchter, M., Andreias, L., Margevicius, S., Taylor, H. G., Drotar, D., et al. (2011). Change in prevalence of chronic conditions between childhood and adolescence among extremely

- low-birth-weight children. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 306(4), 394-401.
- Hall, R. T. (2001). Nutritional follow-up of the breastfeeding premature infant after hospital discharge. *Pediatric Clinics of North America*, 48(2), 453-460.
- Hallman, M., Bry, K., Hoppu, K., Lappi, M. & Pohjavuori, M. (1992). Inositol supplementation in premature infants with respiratory distress syndrome. *New England Journal of Medicine*, 326(19), 1233-1239.
- Hallman, M., Järvenpää, A. L. & Pohjavuori, M. (1986). Respiratory distress syndrome and inositol supplementation in preterm infants. *Archives Disease Child* 61, 1076-1083.
- Hamosh, M. (1994). Breast milk storage: review of the literature and recommendations for research needs. *San Diego: Welestart International*.
- Hamosh, M. (2001). Bioactive factors in human milk. *Pediatric Clinics of North America*, 48(1), 69-86.
- Han, Z., Mulla, S., Beyene, J., Liao, G., McDonald, S. D. & Knowledge Synthesis Group. (2011). Maternal underweight and the risk of preterm birth and low birth weight: A systematic review and meta-analyses. *International Journal of Epidemiology*, 40(1), 65-101.
- Hankins G. D. V., Pacheco L. D. & Soor-Tung Wen T. (2013). Fetal assessment near the limits of viability. *Seminars in Perinatology* 37, 401-403.
- Hao, W. & Lee, Y. (2004). Microflora of the gastrointestinal tract. *Public Health Microbiology* (pp. 491-502) Springer.
- Hardy, H., Harris, J., Lyon, E., Beal, J. & Foey, A. D. (2013). Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: Homeostasis and immunopathology. *Nutrients* 5, 1869-1912.
- Harmsen, H. J., Wildeboer-Veloo, A. C., Raangs, G. C., Wagendorp, A. A., Klijn, N., Bindels, J. G., et al. (2000). Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 30(1), 61-67.
- Hart, S., Boylan, L. M., Carroll, S., Musick, Y. A. & Lampe, R. M. (2003). Brief report: Breast-fed one-week-olds demonstrate superior neurobehavioral organization. *Journal of Pediatric Psychology*, 28(8), 529-534.
- Härtel, C., von Otte, S., Koch, J., Ahrens, P., Kattner, E., Segerer, H. et al. (2005). Polymorphisms of haemostasis genes as risk factors for preterm delivery. *Thrombosis and Haemostasis* 94, 88-92.
- He, C., Shan, Y. & Song, W. (2015). Targeting gut microbiota as a possible therapy for diabetes. *Nutrition Research*. Article in press.
- Hegarty, K., Gunn, J., Chondros, P. & Small, R. (2004). Association between depression and abuse by partners of women attending general practice: Descriptive, cross sectional survey. *British Medical Journal*, 328(7440), 621-624.
- Heikkilä, M. P. & Saris, P. E. (2003). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), 471-478.
- Hemarajata, P. & Versalovic, J. (2013). Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 6 (1), 39-51.
- Hell, E., Giske, C. G., Hultenby, K., Danielsson, K. G. & Marchini, G. (2013). Attachment and biofilm forming capabilities of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from preterm infants. *Current Microbiology*, 67(6), 712-717.
- Henderson, A. (2005). Vitamin D and the breastfed infant. *Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing*, 34(3), 367-372.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B. et al. (2014). Expert consensus

- document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Review: Gastroenterology and Hepatology* 11, 506-514.
- Hitti, J., Riley, D. E., Krohn, M. A., Hillier, S. L., Agnew, K. J., Krieger, J. N. et al. (1997). Broad-spectrum bacterial rDNA polymerase chain reaction assay for detecting amniotic fluid infection among women in premature labor. *Clinical Infectious Diseases* 24, 1228-1232.
- Hnat, M. D., Meadows, J. W., Brockman, D. E., Pitzer, B., Lyall, F. & Myatt, L. (2005). Heat shock protein-70 and 4-hydroxy-2-nonenal adducts in human placental villous tissue of normotensive, preeclamptic and intrauterine growth restricted pregnancies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 193, 836-840.
- Hodge, G., Hodge, S., Haslam, R., McPhee, A., Sepulveda, H., Morgan, E. et al. (2004). Rapid simultaneous measurement of multiple cytokines using 100 µl sample volumes. Association with neonatal sepsis. *Clinical and Experimental Immunology* 137, (2), 402-407.
- Holbrook, A. M. & Kaltenbach, K. A. (2011). Effectiveness of a smoking cessation intervention for methadone-maintained women: A comparison of pregnant and parenting women. *International Journal of Pediatrics*, 2011, ID:567056.
- Honein, M. A., Kirby, R. S., Meyer, R. E., Xing, J., Skerrette, N. I., Yuskiv, N., et al. (2009). The association between major birth defects and preterm birth. *Maternal and Child Health Journal*, 13(2), 164-175.
- Honein, M. A., Rasmussen, S. A., Reefhuis, J., Romitti, P. A., Lammer, E. J., Sun, L., et al. (2007). Maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure and the risk of orofacial clefts. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 18(2), 226-233.
- Hooper, L. V., Midtvedt, T. & Gordon, J. I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 283-307.
- Hooper, L. V. & Gordon, J. I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 292(5519), 1115-1118.
- Hopkins, M. J., Macfarlane, G. T., Furrie, E., Fite, A. & Macfarlane, S. (2005). Characterisation of intestinal bacteria in infant stools using real-time PCR and northern hybridisation analyses. *FEMS Microbiology Ecology* 54, 77-85.
- Howlett, A., Ohlsson, A. & Plakkal, N. (2012). Inositol for respiratory distress syndrome in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*, 14(3), CD000366.
- Hu, J., Nomura, Y., Bashir, A., Fernández-Hernández, H., Itzkowitz, S., Pei, Z., et al. (2013). Diversified microbiota of meconium is affected by maternal diabetes status. *PLoS One*, 8(11), e78257.
- Hunt, K. M., Foster, J. A., Forney, L. J., Schutte, U. M., Beck, D. L., Abdo, Z., et al. (2011). Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One*, 6(6), e21313.
- Hunter, C., Dimaguila, M. A., Gal, P., Wimmer, J. E. Jr, Ransom, J. L., Carlos, R. Q. et al. (2012). Effect of routine probiotic, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, use on rates of necrotizing enterocolitis in neonates with birthweight < 1000 grams: a sequential analysis. *BMC Pediatrics* 12, 142.
- Hurrell, E., Kucerova, E., Loughlin, M., Caubilla-Barron, J., Hilton, A., Armstrong, R., et al. (2009). Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonisation by members of the *Enterobacteriaceae*. *BMC Infectious Diseases*, 13, 146.
- Iams, J. D., Romero, R., Culhane, J. F. & Goldenberg, R. L. (2008). Primary, secondary, and tertiary interventions to reduce the morbidity and mortality of preterm birth. *The Lancet*, 371(9607), 164-175.

- Ibrahim, C. P. & Yoxall, C. W. (2010). Use of self-heating gel mattresses eliminates admission hypothermia in infants born below 28 weeks gestation. *European Journal of Pediatrics*, 169(7), 795-799.
- Indrio, F., Riezzo, G., Raimondi, F., Bisceglia, M., Cavallo, L. & Francavilla, R. (2008). The effects of probiotics on feeding tolerance, bowel habits, and gastrointestinal motility in preterm newborns. *The Journal of Pediatrics* 152, 801-806)
- Institute of Medicine (US). (2007) Committee on Understanding Premature Birth and Assuring Healthy Outcomes; Behrman, R.E., Butler, A.S., editors. Preterm Birth: Causes, Consequences, and Prevention. Washington (DC): National Academies Press (US). Committee on Understanding Premature Birth and Assuring Healthy Outcomes.
- Iriondo, M., Burón, E., Thió, M., Aguayo, J., Salguero, E., Fernández, J. R. et al. (2008). Reanimación neonatal. *Protocolos Diagnóstico Terapéuticos de la AEP: Neonatología*.
- Isolauri, E., Sutas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H. & Salminen, S. (2001). Probiotics: Effects on immunity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(Suppl 2), 444S-450S.
- Jacobs, S. E., Tobin, J. M., Opie, G. F., Donath, S., Tabrizi, S. N., Pirota, M., et al. (2013). Probiotic effects on late-onset sepsis in very preterm infants: A randomized controlled trial. *Pediatrics*, 132(6), 1055-1062.
- Jacobsson, B., Ladfors, L. & Milsom, I. (2004). Advanced maternal age and adverse perinatal outcome. *Obstetrics & Gynecology* 104 (4), 727-733.
- Jacquot, A., Neveu, D., Aujoulat, F., Mercier, G., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., et al. (2011). Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *The Journal of Pediatrics*, 158(3), 390-396.
- Janvier, A., Malo, J. & Barrington, K. J. (2014). Cohort study of probiotics in a north american neonatal intensive care unit. *The Journal of Pediatrics* 164(5),980-985.
- Janvier, A., Lantos, J. & Barrington, K. (2013). The politics of probiotics: probiotics, necrotizing enterocolitis and the ethics of neonatal research. *Acta Paediatrica* 102, 116-118.
- Jeurink, P. V., van Esch, B. C., Rijnierse, A., Garssen, J. & Knippels, L. M. (2013). Mechanisms underlying immune effects of dietary oligosaccharides. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 98(2), 572S-7S.
- Jiao, Y., Zhang, W., Ma, J., Wen, C., Wang, P., Wang, Y., et al. (2011). Early onset of neonatal listeriosis. *Pediatrics International: Official Journal of the Japan Pediatric Society*, 53(6), 1034-1037.
- Jiménez, E., Delgado, S., Fernández, L., García, N., Albuja, M., Gómez, A., et al. (2008a). Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors. *Research in Microbiology*, 159(9-10), 595-601.
- Jiménez, E., Delgado, S., Maldonado, A., Arroyo, R., Albuja, M., García, N., et al. (2008b). *Staphylococcus epidermidis*: A differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC Microbiology*, 8, 143.
- Jiménez, E., Fernández, L., Marín, M. L., Martín, R., Odriozola, J. M., Nueno-Palop, C., et al. (2005). Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Current Microbiology*, 51(4), 270-274.
- Jiménez, E., Marín, M. L., Martín, R., Odriozola, J. M., Olivares, M., Xaus, J., et al. (2008c). Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in Microbiology*, 159(3), 187-193.
- Johansson, D. & Rasmussen, M. (2012). Virulence factors in isolates of *Enterococcus faecalis* from infective endocarditis and from the normal flora. *Microbial Pathogenesis* 55, 28-31.

- Johnson, C. L. & Versalovic, J. (2012). The Human Microbiome and Its Potential Importance to Pediatrics. *Pediatrics* 129, 1-11.
- Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Menard, M., Gajewski, A., Xercavins, M. & Garau, J. (2006). Similarity between human and chicken *Escherichia coli* isolates in relation to ciprofloxacin resistance status. *The Journal of Infectious Diseases*, 194(1), 71-78.
- Johnson, S., Hollis, C., Kochhar, P., Hennessy, E., Wolke, D. & Marlow, N. (2010). Autism spectrum disorders in extremely preterm children. *The Journal of Pediatrics*, 156(4), 525-31.
- Johnson, S. & Marlow, N. (2011). Preterm birth and childhood psychiatric disorders. *Pediatric Research*, 69(5), 11R-8R.
- Johnson, T. J., Patel, A. L., Bigger, H. R., Engstrom, J. L. & Meier, P. P. (2013). Economic benefits and costs of human milk feedings: A strategy to reduce the risk of prematurity-related morbidities in Very-Low-Birth-Weight infants. *Advances in Nutrition* 5, 207-212.
- Jones, B. L., Gorman, L. J., Simpson, J., Curran, E. T., McNamee, S., Lucas, C. et al. (2000). An outbreak of *Serratia marcescens* in two neonatal intensive care units. *Journal of Hospital Infection* 46, 314-319.
- Josefsson, S., Bunn, S. K. & Domellöf, M. (2007). Fecal calprotectin in very low birth weight infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 44 (4), 407-413.
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C. & Chassard, C. (2013). Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *The British Journal of Nutrition*, 110 (7), 1253-1262.
- Jóźwik, M., Jóźwik, M., Teng, C., Jóźwik, M. & Battaglia, F. C. (2013). Human breast milk sugars and polyols over the first 10 puerperium days. *American Journal of Human Biology*, 25(2), 198-204.
- Kalra, S. K. & Molinaro, T. A. (2008). The association of *in vitro* fertilization and perinatal morbidity. *Seminars in Reproductive Medicine*, 26(05) 423-435.
- Kaprio, J. & Marttila, R. (2005). Demographic trends in nordic countries. *Multiple Pregnancy: Epidemiology, Gestation & Perinatal Outcome*, 22-25.
- Keijzer-Veen, M. G., Devos, A. S., Meradji, M., Dekker, F. W., Nauta, J. & van der Heijden, B. J. (2010). Reduced renal length and volume 20 years after very preterm birth. *Pediatric Nephrology*, 25(3), 499-507.
- Kent, A. L., Wright, I. M., Abdel-Latif, M. E. & New South Wales and Australian Capital Territory Neonatal Intensive Care Units Audit Group. (2012). Mortality and adverse neurologic outcomes are greater in preterm male infants. *Pediatrics*, 129(1), 124-131.
- Kerkhof, G. F., Breukhoven, P. E., Leunissen, R. W., Willemsen, R. H. & Hokken-Koelega, A. C. (2012). Does preterm birth influence cardiovascular risk in early adulthood? *The Journal of Pediatrics*, 161(3), 390-396.e1.
- Kitajima, H., Sumida, Y., Tanaka, R., et al. (1997). Early administration of *Bifidobacterium breve* to preterm infants: randomised controlled trial. *Archives of Diseases in Childhood: Fetal and Neonatal Edition* 76, F101-107.
- Kliegman, R. M. (2013). Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Journal of Pediatrics* 146 (5), 710.
- Klingenberg, C., Embleton, N. D., Jacobs, S. E., O'Connell, L. A. & Kuschel, C. A. (2012). Enteral feeding practices in very preterm infants: An international survey. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 97(1), F56-61.
- Koenig, A., de Albuquerque Diniz, E. M., Barbosa, S. F. & Vaz, F. A. (2005). Immunologic factors in human milk: The effects of gestational age and pasteurization. *Journal of Human Lactation: Official Journal of International Lactation*

- Consultant Association*, 21(4), 439-443.
- Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., et al. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (Suppl 1), 4578-4585.
- Kornman, K. S. & Loesche, W. J. (1980). The subgingival microbial flora during pregnancy. *Journal of Periodontal Research*, 15(2), 111-122.
- Kotecha, S. J., Watkins, W. J., Paranjothy, S., Dunstan, F. D., Henderson, A. J. & Kotecha, S. (2012). Effect of late preterm birth on longitudinal lung spirometry in school age children and adolescents. *Thorax*, 67(1), 54-61.
- Kuppala, V. S., Meinen-Derr, J., Morrow, A. L. & Schibler, K. R. (2012). Prolonged initial empirical antibiotic treatment is associated with adverse outcomes in premature infants. *The Journal of Pediatrics* 159 (5), 720-725.
- Lagier, J. C., Hugon, P., Khelaifia, S., Fournier, P. E., La Scola, B. & Raoult, D. (2015). The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clinical Microbiology Review* 28, 237-264.
- Landers, S. & Updegrave, K. (2010). Bacteriological Screening of Donor Human Milk Before and After Holder Pasteurization. *Breastfeeding Medicine* 5 (3), 117-121.
- Lapillonne, A., O'Connor, D. L., Wang, D. & Rigo, J. (2013). Nutritional recommendations for the late-preterm infant and the preterm infant after hospital discharge. *The Journal of Pediatrics*, 162(3), S90-S100.
- LaTuga, M. S., Ellis, J. C., Cotton, C. M., Goldberg, R. N., Wynn, J. L., Jackson, R. B., et al. (2011). Beyond bacteria: A study of the enteric microbial consortium in extremely low birth weight infants. *PloS One*, 6(12), e27858.
- Law, B. J., Urias, B. A., Lertzman, J., Robson, D. & Romance, L. (1989). Is ingestion of milk-associated bacteria by premature infants fed raw human milk controlled by routine bacteriologic screening? *Journal of Clinical Microbiology* 27 (7), 1560-1566.
- Lawn, J. E., Gravett, M. G., Nunes, T. M., Rubens, C. E., Stanton, C. & GAPPs Review Group. (2010). Global report on preterm birth and stillbirth (1 of 7): Definitions, description of the burden and opportunities to improve data. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 10 (Suppl 1), S1.
- Lee da, E., Park, S. Y., Choi, J. S., Kim, S. Y., Lim, J. H., Yang, J. H., et al. (2012). Early second trimester maternal plasma levels of thrombin-inhibitor complexes and subsequent spontaneous preterm delivery. *Prenatal Diagnosis*, 32(12), 1170-1173.
- Leitich, H., Bodner-Adler, B., Brunbauer, M., Kaider, A., Egarter, C. & Husslein, P. (2003). Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: A meta-analysis. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 189 (1), 139-147.
- Lennox-King, S., O'Farrell, S., Bettelheim, K. & Shooter, R. (1976a). Colonization of caesarean section babies by *Escherichia coli*. *Infection*, 4(3), 134-138.
- Lennox-King, S., O'Farrell, S., Bettelheim, K. & Shooter, R. (1976b). *Escherichia coli* isolated from babies delivered by caesarean section and their environment. *Infection*, 4(3), 139-145.
- Ley, R. E., Peterson, D. A. & Gordon, J. I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124, 837-848.
- Ley, R. E. (2010). Obesity and the human microbiome. *Current Opinion in Gastroenterology* 26 (1), 5-11.
- Lim, J. W. (2011). The changing trends in live birth statistics in Korea, 1970 to 2010. *Korean Journal of Pediatrics*, 54(11), 429-435.
- Lin, H. C., Su, B. H., Chen, A. C., Lin, T. W., Tsai, C. H., Yeh, T. F. et al.

- (2005). Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* 115, 1.4.
- Lin, Y. P., Thibodeaux, C. H., Peña, J. A., Ferry, G. D. & Versalovic, J. (2008). Probiotic *Lactobacillus reuteri* suppress proinflammatory cytokines via c-Jun. *Inflammatory Bowel Disease* Volume 14 (8), 1068-1083.
- Liu, L., Johnson, H. L., Cousens, S., Perin, J., Scott, S., Lawn, J. E., et al. (2012). Global, regional, and national causes of child mortality: An updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*, 379(9832), 2151-2161.
- Logan, L. K., Healy, S. A., Kabat, W. J., Liu, G., Sullivan, C. L., Peaceman, A. M., et al. (2013). A prospective cohort pilot study of the clinical and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in pregnant women at the time of group B streptococcal screening in a large urban medical center in Chicago, IL, USA. *Virulence*, 4(7), 654-658.
- López, C. & Menard, O. (2011). Human milk fat globules: Polar lipid composition and in situ structural investigations revealing the heterogeneous distribution of proteins and the lateral segregation of sphingomyelin in the biological membrane. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 83, 29-41.
- Lucas, A. & Cole, T. J. (1990). Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet*, 336(8730), 1519-1523.
- Ludington-Hoe, S. M. & Swinth, J. Y. (1996). Developmental aspects of kangaroo care. *Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing*, 25(8), 691-703.
- Ludington-Hoe, S. M. (2013). Kangaroo Care as a Neonatal Therapy. *Newborn & Infant Nursing Reviews* 13, 73-75.
- Lundequist, B., Nord, C. E. & Winberg, J. (1985). The composition of the faecal microflora in breastfed and bottle fed infants from birth to eight weeks. *Acta Paediatrica Scandinavica*, 74(1), 45-51.
- Luoto, R., Isolauri, E. & Lehtonen, L. (2010). Safety of Lactobacillus GG probiotic in infants with very low birth weight: twelve years of experience. *Clinical Infectious Diseases* 50, 1327-1328.
- Lusyati, S., Hulzebos, C. V., Zandvoort, J., Sukandar, H. & Sauer, P. J. (2013). Cytokines patterns in newborn infants with late onset sepsis. *Journal of Neonatal-Perinatal Medicine*, 6(2), 153-163.
- Macey, T. J., Harmon, R. J. & Easterbrooks, M. A. (1987). Impact of premature birth on the development of the infant in the family. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 55(6), 846-852.
- Mackie, R. I., Sghir, A. & Gaskins, H. R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(5), 1035S-1045S.
- Macnow, T., O'Toole, D., DeLaMora, P., Murray, M., Rivera, K., Whittier, S., et al. (2013). Utility of surveillance cultures for antimicrobial resistant organisms in infants transferred to the neonatal intensive care unit. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 32(12), E443-E450.
- Macpherson, A. J., & Harris, N. L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews: Immunology* 4, 478-485.
- Madan, J. C., Salari, R. C., Saxena, D., Davidson, L., O'Toole, G. A., Moore, J. H., et al. (2012). Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, 97(6), F456-F462.
- Maggio, L., Costa, S. & Gallina, F. (2009). Human milk fortifiers in very low birth weight infants. *Early Human Development* 85, S59-S61.
- Magne, F., Abely, M., Boyer, F., Morville, P., Pochart, P. & Suau, A. (2006). Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by sequences of 16S rRNA genes and

- PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles. *FEMS Microbiology Ecology*, 57(1), 128-138.
- Mai, V., Torrazza, R. M., Ukhanova, M., Wang, X., Sun, Y., Li, N., et al. (2013). Distortions in development of intestinal microbiota associated with late onset sepsis in preterm infants. *PloS One*, 8(1), e52876.
- Mai, V., Young, C. M., Ukhanova, M., Wang, X., Sun, Y., Casella, G., et al. (2011). Fecal microbiota in premature infants prior to necrotizing enterocolitis. *PloS One*, 6(6), e20647.
- Makino, H., Kushiro, A., Ishikawa, E., Muylaert, D., Kubota, H., Sakai, T. et al. (2011). Transmission of intestinal *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains from mother to infant, determined by multilocus sequencing typing and amplified fragment length polymorphism. *Applied Environmental Microbiology* 77, 6788-6893.
- Maldonado-Contreras, A., Goldfarb, K. C., Godoy-Vitorino, F., Karaoz, U., Contreras, M., Blaser, M. J. et al. (2011). Structure of the human gastric bacterial community in relation to *Helicobacter pylori* status. *The ISME Journal* 5 (4), 574-579.
- Mally, P. V., Bailey, S. & Hendricks-Muñoz, K. D. (2010). Clinical Issues in the Management of Late Preterm Infants. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care* 40, 218-233.
- Mandy, G. T. (2011). Incidence and mortality of the premature infant. *UpToDate®*.
- Manzoni, P., Stolfi, I., Pedicino, R., Vagnarelli, F., Mosca, F., Pagni, L. et al. (2013). Human milk feeding prevents retinopathy of prematurity (ROP) in preterm VLBW neonates. *Early Human Development* 89S1, S64-S68.
- Manzoni, P., Lista, G., Gallo, E., Marangione, P., Priolo, C., Fontana, P. et al. (2011). Routine *Lactobacillus rhamnosus* GG administration in VLBW infants: A retrospective, 6-year cohort study. *Early Human Development* 87, S35-S38.
- Manzoni, P., Mostert, M., Leonessa, M. et al. (2006). Oral supplementation with *Lactobacillus casei* subspecies *rhamnosus* prevents enteric colonization by *Candida* species in preterm neonates: a randomized study. *Clinical Infectious Diseases* 42,1735-1742.
- Marchant, E. A., Boyce, G. K., Sadarangani, M. & Lavoie, P. M. (2013). Neonatal sepsis due to coagulase-negative staphylococci. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013, 586076.
- Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimaraes, V., Sokol, H., Dore, J., et al. (2009). The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiology*, 9, 123-2180-9-123.
- Marín, M. L., Arroyo, R., Jiménez, E., Gómez, A., Fernández, L. & Rodríguez, J. M. (2009). Cold storage of human milk: Effect on its bacterial composition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 49(3), 343-348.
- Marlow, N., Wolke, D., Bracewell, M. A. & Samara, M. (2005). Neurologic and Developmental Disability at Six Years of Age after Extremely Preterm Birth. *The New England Journal of Medicine* 352 (1), 9-19.
- Martín, V., Maldonado-Barragán, A., Moles, L., Rodríguez-Baños, M., Campo, R. D., Fernández, L. et al. (2012). Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *Journal of Human Lactation* 28, 36-44.
- Martín, J. A., Hamilton, B. E., Sutton, P. D., Ventura, S. J., Mathews, T. J. & Osterman, M. J. (2010). Births: Final data for 2008. *National Vital Statistics Reports: From the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System*, 59(1), 1, 3-71.
- Martín, R., Heilig, G. H., Zoetendal, E. G., Smidt, H. & Rodríguez, J. M. (2007a). Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk

- and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2638-2644.
- Martín, R., Heilig, H., Zoetendal, E. G., Jiménez, E., Fernández, L., Smidt, H., et al. (2007b). Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Research in Microbiology*, 158(1), 31-37.
- Martín, R., Jiménez, E., Heilig, H., Fernández, L., Marín, M. L., Zoetendal, E. G., et al. (2009). Isolation of *Bifidobacteria* from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 965-969.
- Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M. L., Xaus, J., et al. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics*, 143(6), 754-758.
- Martino, D. J., Currie, H., Taylor, A., Conway, P. & Prescott, S. L. (2008). Relationship between early intestinal colonization, mucosal immunoglobulin A production and systemic immune development. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 38(1), 69-78.
- Matamoros, S., Gras-Leguen, C., Le Vacon, F., Potel, G. & de La Cochetiere, M. F. (2013). Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends in Microbiology* 21 (4), 167-173.
- Matoba, N., Yu, Y., Mestan, K., Pearson, C., Ortiz, K., Porta, N., et al. (2009). Differential patterns of 27 cord blood immune biomarkers across gestational age. *Pediatrics*, 123(5), 1320-1328.
- Mattarelli, P., Brandi, G., Calabrese, C., Fornari, F., Prati, G. M., Biavati, B. et al. (2014). Occurrence of *Bifidobacteriaceae* in human hypochlorhydria stomach. *Microbial Ecology in Health and Disease* 25, 21379.
- McCall, E. M., Alderdice, F., Halliday, H. L., Jenkins, J. G. & Vohra, S. (2010). Interventions to prevent hypothermia at birth in preterm and/or low birthweight infants. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (3), CD004210.
- McCormick, M. C., Litt, J. S., Smith, V. C. & Zupancic, J. A. F. (2011). Prematurity: An overview and public health implications. *Annual Reviews Public Health*, 32, 367-379.
- McDonald, S. D., Han, Z., Mulla, S., Beyene, J. & Knowledge Synthesis Group. (2010). Overweight and obesity in mothers and risk of preterm birth and low birth weight infants: Systematic review and meta-analyses. *British Medical Journal*, 341, c3428.
- McFall-Ngai, M., Hadfield, M. G., Bosch, T. C., Carey, H. V., Domazet-Lošo, T. & Douglas, A. E. (2013). *PNAS* 110 (9), 3229-3236.
- Mehall, J. R., Kite, C. A., Gilliam, C. H., Jackson, R. J. & Smith, S. D. (2002a). Enteral feeding tubes are a reservoir for nosocomial antibiotic-resistant pathogens. *Journal of Pediatric Surgery*, 37(7), 1011-1012.
- Mehall, J. R., Kite, C. A., Saltzman, D. A., Walleit, T., Jackson, R. J. & Smith, S. D. (2002b). Prospective study of the incidence and complications of bacterial contamination of enteral feeding in neonates. *Journal of Pediatric Surgery*, 37(8), 1177-1182.
- Meier, P. P. & Bode, L. (2013). Health, Nutrition, and Cost Outcomes of Human Milk Feedings for Very Low Birthweight Infants. *Advances in Nutrition* 4, 670-671.
- Menon, R. (2008). Spontaneous preterm birth, a clinical dilemma: Etiologic, pathophysiologic and genetic heterogeneities and racial disparity. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 87(6), 590-600.
- Michalowicz, B. S., Hodges, J. S., DiAngelis, A. J., Lupo, V. R., Novak, M. J., Ferguson, J. E. et al. (2006). Treatment of Periodontal Disease

- and the Risk of Preterm Birth. *The New England Journal of Medicine* 355, 1885-1894.
- Mihatsch, W. A., Vossbeck, S., Eikmanns, B. et al. (2010). Effect of *Bifidobacterium lactis* on the incidence of nosocomial infections in very-low-birth weight infants: a randomized controlled trial. *Neonatology* 98, 156-63.
- Millisavljevic, V., Garg, M., Vuletic, I., Miller, J. F., Kim, L., Cunningham, T. D. et al. (2013). Prospective assessment of the gastroesophageal microbiome in VLBW neonates. *BMC Pediatrics* 13, 49. doi:10.1186/1471-2431-13-49.
- Miniño, A. M. & Murphy, S. L. (2012). Death in the United States, 2010. *NCHS Data Brief*, 99(10), 1-8.
- Mohan, R., Koebnick, C., Schildt, J., Mueller, M., Radke, M. & Blaut, M. (2008). Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on body weight, fecal pH, acetate, lactate, calprotectin, and IgA in preterm infants. *Pediatric Research*, 64(4), 418-422.
- Mohan, R., Koebnick, C., Schildt, J., Schmidt, S., Mueller, M., Possner, M. et al. (2006). Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (11), 4025-4031.
- Molinari, C. E., Casadio, Y. S., Arthur, P. G. & Hartmann, P. E. (2011). The effect of storage at 25° C on proteins in human milk. *International Dairy Journal* 21, 286-293.
- Moltó-Puigmarfí, C., Castellote, A. I., Carbonell-Estrany, X. & López-Sabater, M. C. (2011). Differences in fat content and fatty acid proportions among colostrum, transitional, and mature milk from women delivering very preterm, preterm, and term infants. *Clinical Nutrition*, 30(1), 116-123.
- Monasterolo, R. C., Pico, M. C., Martínez, G. R. & de Pipaón, M. S. (2013). Guía de nutrición enteral en recién nacidos de muy bajo peso. revisión sistemática de las evidencias científicas. *Grupo de Nutrición y Metabolismo de la SEN*, 7(3), 84-110.
- Montagne, P., Cuillière, M. L., Molé, C., Béné, M. C. & Faure, G. (1999). Immunological and nutritional composition of human milk in relation to prematurity and mothers' parity during the first 2 weeks of lactation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 29(1), 75-80.
- Montgomery, R. K., Mulberg, A. E. & Grand, R. J. (1999). Development of the Human Gastrointestinal Tract: Twenty Years of Progress. *Gastroenterology* 116, 702-731.
- Montiel-Castro, A. J., González-Cervantes, R. M., Bravo-Ruiseco, G. & Pacheco-López, G. (2013). The microbiota-gut-brain axis: neurobehavioral correlates, health and sociality. *Frontiers in Integrative Neuroscience* 7, 7-70.
- Moore, E. R., Anderson, G. C., Bergman, N. & Dowswell, T. (2012). Early skin-to-skin contact for mothers and their healthy newborn infants. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 5, CD003519.
- Moore, M. L. (2002). Preterm birth: A continuing challenge. *The Journal of Perinatal Education*, 11(4), 37-40.
- Morelli, L. (2008). Postnatal development of intestinal microflora as influenced by infant nutrition. *Journal of Nutrition* 138, 1791S-1795S.
- Morrow, A. L., Lagomarcino, A. J., Schibler, K. R., Taft, D. H., Yu, Z., Wang, B., et al. (2013). Early microbial and metabolomic signatures predict later onset of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Microbiome*, 1(1), 1-13.
- Mosqueda, E., Sapiegiene, L., Glynn, L., Wilson-Costello, D. & Weiss, M. (2008). The early use of minimal enteral nutrition in extremely low birth weight newborns. *Journal of Perinatology*, 28(4), 264-269.
- Moutquin, J. M. (2003). Socio-economic and psychosocial factors in the management and prevention of preterm labour. *International*

- Journal of Obstetrics and Gynaecology* 110 (S20), 56-60.
- Mshvildadze, M., Neu, J. & Mai, V. (2011). Intestinal microbiota development in the premature neonate: establishment of a lasting commensal relationship? *Nutrition Reviews* 66 (11), 658-663.
- Mshvildadze, M., Neu, J., Shuster, J., Theriaque, D., Li, N. & Mai, V. (2010). Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques. *The Journal of Pediatrics*, 156(1), 20-25.
- Muglia, L. J. & Katz, M. (2010). The enigma of spontaneous preterm birth. *The New England Journal of Medicine*, 362(6), 529-535.
- Mukhopadhyay, N. & Arulkumaran, S. (2007). Reproductive outcomes after *in-vitro* fertilization. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 19(2), 113-119.
- Murk, W., Risnes, K. R. & Bracken, M. B. (2011). Prenatal or early-life exposure to antibiotics and risk of childhood asthma: A systematic review. *Pediatrics*, 127(6), 1125-1138.
- Murphy, D. J. (2007). Epidemiology and environmental factors in preterm labour. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 21 (5), 773-789.
- Narang, A. P. S., Bains, H. S., Kansal, S. & Singh, D. (2006). Serial composition of human milk in preterm and term mothers. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 21 (1), 89-94.
- Narayanan, I., Prakash, K., Murthy, N. S. & Gujral, V. V. (1984). Randomised controlled trial of effect of raw and holder pasteurised human milk and of formula supplements on incidence of neonatal infection. *Lancet*, 2(8412), 1111-1113.
- Narbona, E., Uberos, J., Armadá, M. I., Couce, M. L., Rodríguez, G. & Saenz de Pipaon, M. (2014). Nutrition and metabolism group of the spanish neonatology society: Recommendations and evidence for dietary supplementation with probiotics in very low birth weight infants. *Anales de Pediatría* 81, 397.e1-397.e8.
- National Collaborating Centre for Women's and Children's Health UK. (2004). Caesarean section. *NICE Clinical Guidelines*, 13. London: RCOG. Obtenida en Abril 2014 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK45651/>.
- Ng, D. K., Lee, S. Y. R., Leung, L. C. K., Wong, S. F. & Ho, J. C. S. (2004). Bacteriological screening of expressed breast milk revealed a high rate of bacterial contamination in Chinese women. *Journal of Hospital Infection* 58, 146-150.
- Ng, P. C., Lewindon, P. J., Siu, Y. K., Wong, W., Cheung, K. L. & Liu, K. (1995). Bacterial contaminated breast milk and necrotizing enterocolitis in preterm twins. *Journal of Hospital Infection* 31, 105-110.
- Niermeyer, S., Kattwinkel, J., Van Reempts, P., Nadkarni, V., Phillips, B., Zideman, D., et al. (2000). International guidelines for neonatal resuscitation: An excerpt from the guidelines 2000 for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care: International consensus on science. contributors and reviewers for the neonatal resuscitation guidelines. *Pediatrics*, 106(3), E29.
- Normann, E., Fahlen, A., Engstrand, L. & Lilja, H. E. (2013). Intestinal microbial profiles in extremely preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatrica*, 102(2), 129-136.
- Nosarti, C., Reichenberg, A., Murray, R. M., Cnattingius, S., Lambe, M. P., Yin, L., et al. (2012). Preterm birth and psychiatric disorders in young adult life. *Archives of General Psychiatry*, 69(6), E1-8.
- Okamoto, T., Hayashi, Y., Mizuno, H., Yanai, H., Nishikawa, J., Nakazawa, T. et al. (2014). Colonization of an acid resistant *Kingella denitrificans* in the stomach may contribute to gastric dysbiosis by *Helicobacter pylori*. *Journal of Infection and Chemotherapy* 20, 169-174.
- Olver, W. J., Bond, D. W., Boswell, T. C. & Watkin, S. L. (2000). Neonatal

- group B streptococcal disease associated with infected breast milk. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition* 83, F48-F49.
- OMS. (1985). Appropriate technology for birth. *Lancet*, 2(8452), 436-437.
- OMS. (2003). Guidelines for medico-legal care of victims of sexual violence. Geneva.
- OMS. (2005a). Addressing violence against women and achieving the millennium development goals. Geneva.
- OMS. (2005c). The World Health Report 2005: Make every mother and child count. Geneva.
- OMS. (2009). WHO, Child growth standards and the identification of severe acute malnutrition in infants and children. Obtenida el 4 de diciembre, 2014, de <http://www.who.int/childgrowth/en/>
- OMS. (2011). Overweight and obesity: Fact sheet 311. Geneva.
- OMS. (2012). Born too soon: The global action report on preterm birth. Geneva.
- Oncel, M. Y., Sari, F. N., Arayici, S., Guzoglu, N., Erdeve, O., Uras, N., et al. (2014). *Lactobacillus reuteri* for the prevention of necrotising enterocolitis in very low birthweight infants: A randomised controlled trial. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 99(2), F110-5.
- O'Toole, P. W. & Claesson, M. J. (2010). Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly. *International Dairy Journal*, 20(4), 281-291.
- Ottman, N., Smidt, H., de Vos, W. M. & Belzer, C. (2012). The function of our microbiota: Who is out there and what do they do? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 104.
- Otto, M. P., Martín, E., Badiou, C., Lebrun, S., Bes, M., Vandenesch, F., et al. (2013). Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(7), 1524-1532.
- Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A. & Brown, P. O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biology*, 5(7), e177.
- Papí, A. G., Alonso, C. P. & Maldonado, J. A. (2007). El método de la madre canguro. *Acta Pediátrica Española*, 65(6), 286-291.
- Park, E., Schultz, J., Tudiver, F., Campbell, T. & Becker, L. (2004). Enhancing partner support to improve smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev*, 3.
- Parkinson, J. R., Hyde, M. J., Gale, C., Santhakumaran, S. & Modi, N. (2013). Preterm birth and the metabolic syndrome in adult life: A systematic review and meta-analysis. *Pediatrics*, 131(4), e1240-63.
- Patel, R. R., Steer, P., Doyle, P., Little, M. P. & Elliott, P. (2004). Does gestation vary by ethnic group? A London-based study of over 122,000 pregnancies with spontaneous onset of labour. *International Journal of Epidemiology*, 33(1), 107-113.
- Patole, S., Keil, A. D., Chang, A., Nathan, E., Doherty, D., Simmer, K., et al. (2014). Effect of *Bifidobacterium breve* M-16V supplementation on fecal bifidobacteria in preterm neonates: a randomised double blind placebo controlled trial. *PloS One*, 9(3), e89511.
- Pelzer, E. S., Allan, J. A., Waterhouse, M. A., Ross, T., Beagley, K. W. & Knox, C. L. (2013). Microorganisms within human follicular fluid: Effects on IVF. *Plos One* 8 (3), 1-10.
- Peman, J., Zaragoza, R. & Salavert, M. (2013). Prevention and control of nosocomial and health-care facilities associated infections caused by species of *Candida* and other yeasts. [Control y prevención de las infecciones nosocomiales y asociadas a cuidados sanitarios causadas por especies de *Candida* y otras levaduras] *Revista Española de Quimioterapia: Publicacion Oficial*

- de la Sociedad Española de Quimioterapia, 26(4), 298-311.
- Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., et al. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, 118(2), 511-521.
- Pendleton, J. N., Gorman, S. P. & Gilmore, B. F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review in Anti Infective Therapy* 11 (3), 297-308.
- Pereira, G. R., Baker, L., Egler, J., Corcoran, L. & Chiavacci, R. (1990). Serum myoinositol concentrations in premature infants fed human milk, formula for infants, and parenteral nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 51(4), 589-593.
- Perez, P. F., Dore, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., et al. (2007). Bacterial imprinting of the neonatal immune system: Lessons from maternal cells? *Pediatrics*, 119(3), e724-32.
- Perrella, S. L., Williams, J., Nathan, E. A., Fenwick, J., Hartmann, P. E. & Geddes, D. (2012). Influences on breastfeeding outcomes for healthy term and preterm/sick infants. *Breastfeeding Medicine* 7 (4), 255-261.
- Peskin, E. G. & Reine, G. M. (2002). A guest editorial: What is the correct cesarean rate and how do we get there? *Obstetrical & Gynecological Survey*, 57(4), 189-190.
- Petrof, E. O., Gloor, G. B., Vanner, S. J., Weese, S. J., Carter, D., Daigneault, M. C., et al. (2013). Stool substitute transplant therapy for the eradication of *Clostridium difficile* infection: 'RePOOPulating' the gut. *Microbiome*, 1(1), 3-2618-1-3.
- Pinto-Martín, J. A., Levy, S. E., Feldman, J. F., Lorenz, J. M., Paneth, N. & Whitaker, A. H. (2011). Prevalence of autism spectrum disorder in adolescents born weighing <2000 grams. *Pediatrics*, 128(5), 883-891.
- Platt, M. J., Cans, C., Johnson, A., Surman, G., Topp, M., Torrioli, M. G., et al. (2007). Trends in cerebral palsy among infants of very low birthweight (<1500 g) or born prematurely (<32 weeks) in 16 european centres: A database study. *Lancet*, 369(9555), 43-50.
- Plunkett, J. & Muglia, L. J. (2008). Genetic contributions to preterm birth: Implications from epidemiological and genetic association studies. *Annals of Medicine*, 40(3), 167-195.
- Polin, R. A., Denson, S., Brady, M. T., Committee on Fetus and Newborn & Committee on Infectious Diseases. (2012). Epidemiology and diagnosis of health care-associated infections in the NICU. *Pediatrics*, 129(4), e1104-9.
- Powell, T. L., Parker, L., Dedrick, C. F., Barrera, C. M., Di Salvo, D., Erdman, F. et al. (2012). Decisions and dilemmas related to resuscitation of infants born on the verge of viability. *Newborn & Infant Nursing Reviews* 12 (1), 27-32.
- Premji, S. S. & Chessell, L. (2011). Continuous nasogastric milk feeding versus intermittent bolus milk feeding for premature infants less than 1500 grams. *Cochrane Database Syst Rev*, 11, CD001819.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59-65.
- Quigley, M. A., Henderson, G., Anthony, M. Y. & McGuire, W. (2007). Formula milk versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4)(4), CD002971.
- Quigley, M. A., Poulsen, G., Boyle, E., Wolke, D., Field, D., Alfirevic, Z., et al. (2012). Early term and late preterm birth are associated with poorer school performance at age 5 years: A cohort study. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 97(3), F167-73.
- Rauch, M. & Lynch, S. V. (2012). The potential for probiotic manipulation of the gastrointestinal microbiome. *Current Opinion in Biotechnology* 23, 192-201.

- Rautava, S., Luoto, R., Salminen, S. & Isolauri, E. (2012). Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 9(10), 565-576.
- Realì, A., Greco, F., Fanaro, S., Atzei, A., Puddu, M., Moi, M. et al. (2010). Fortification of maternal milk for very low birth weight (VLBW) pre-term neonates. *Early Human Development* 86, S33-S36.
- Reid, G., Brigidì, P., Burton, J. P., Contractor, N., Duncan, S., Fagier, E. et al. (2014). Microbes central to human reproduction. *American Journal of Reproductive Immunology* 72 (3), 1-11.
- Renz, H., Brandtzaeg, P. & Hønef, M. (2012). The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 12(1), 9-23.
- Requejo, J., Althabe, F., Merialdi, M., Keller, K., Katz, J. & Menon, R. (2013). Born too soon: Care during pregnancy and childbirth to reduce preterm deliveries and improve health outcomes of the preterm baby. *Reprod Health*, 10(Suppl 1), S4.
- Richter, M., Topf, H. G., Gröschl, M., Fröhlich, T., Tzschope, A., Wenzl, T. G. et al. (2010). Influence of Gestational Age, Cesarean Section, and Type of Feeding on Fecal Human β -Defensin 2 and Tumor Necrosis Factor- α . *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* 51, 103-105.
- Riedel, C. U., Schwiertz, A. & Egert, M. (2014). The stomach and small and large intestinal microbiomes. In *Marchesi JR (ed), The Human Microbiota and Microbiome*. CAB International, Wallingford, UK, 1-18.
- Rock, C. L., Flatt, S. W., Sherwood, N. E., Karanja, N., Pakiz, B. & Thomson, C. A. (2010). Effect of a free prepared meal and incentivized weight loss program on weight loss and weight loss maintenance in obese and overweight women: A randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association*, 304(16), 1803-1810.
- Rodríguez, J. M. (2015). Probióticos: del laboratorio al consumidor. *Nutrición Hospitalaria* 31(S1), 33-47.
- Rodríguez, J. M. (2014). The Origin of human milk bacteria: Is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Advances in Nutrition* 5, 779-784.
- Rodríguez, N. A., Meier, P. P., Groer, M. W., Zeller, J. M., Engstrom, J. L. & Fogg, L. (2010). A pilot study to determine the safety and feasibility of oropharyngeal administration of own mother's colostrum to extremely low-birth-weight infants. *Advances in Neonatal Care: Official Journal of the National Association of Neonatal Nurses*, 10(4), 206-212.
- Roger, L. C., Costabile, A., Holland, D. T., Hoyles, L. & McCartney, A. L. (2010). Examination of faecal *Bifidobacterium* populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life. *Microbiology*, 156(11), 3329-3341.
- Rogosch, T., Kerzel, S., Hoss, K., Hoersch, G., Zemlin, C., Heckmann, M., et al. (2012). IgA response in preterm neonates shows little evidence of antigen-driven selection. *Journal of Immunology*, 189(11), 5449-5456.
- Rojas, M. A., Lozano, J. M., Rojas, M. X., Rodriguez, V. A., Rondon, M. A., Bastidas, J. A. et al. (2012). Prophylactic probiotics to prevent death and nosocomial infection in preterm infants. *Pediatrics* 130 (5), e1113-e1120.
- Romeo, M. G., Romeo, D. M., Trovato, L., Oliveri, S., Palermo, F., Cota, F. et al. (2011). Role of probiotics in the prevention of the enteric colonization by *Candida* in preterm newborns: incidence of late-onset sepsis and neurological outcome. *Journal of Perinatology* 31, 63-69.
- Romero, R., Nicolaides, K., Conde-Agudelo, A., Tabor, A., O'Brien, J. M., Cetingoz, E., et al. (2012). Vaginal progesterone in women with an asymptomatic sonographic short cervix in the

- midtrimester decreases preterm delivery and neonatal morbidity: A systematic review and metaanalysis of individual patient data. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 206(2), 124e1-124e19.
- Rønnestad, A., Abrahamsen, T. G., Medbo, S., Reigstad, H., Lossius, K., Kaaresen, P. I., et al. (2005). Late-onset septicemia in a norwegian national cohort of extremely premature infants receiving very early full human milk feeding. *Pediatrics*, 115(3), e269-76.
- Rosal, T., de Pipaón, M., Martínez, M., Dorronsoro, I. & Quero, J. (2008). Alimentación parenteral, líquidos y electrolitos. *Protocolos Diagnóstico Terapeúticos de la AEP: Neonatología*, 101-110.
- Rotimi, V. O., Olowe, S. A. & Ahmed, I. (1985). The development of bacterial flora of premature neonates. *Journal of Hygiene* 94, 309-318
- Rotteveel, J., van Weissenbruch, M. M., Twisk, J. W. & Delemarre-Van de Waal, H. A. (2008). Infant and childhood growth patterns, insulin sensitivity, and blood pressure in prematurely born young adults. *Pediatrics*, 122(2), 313-321.
- Rougé, C., Goldenberg, O., Ferraris, L., Berger, B., Rochat, F., Legrand, A., et al. (2010). Investigation of the intestinal microbiota in preterm infants using different methods. *Anaerobe*, 16(4), 362-370.
- Rougé, C., Piloquet, H., Butel, M. J., Berger, B., Rochat, F., Ferraris, L. et al. (2009). Oral supplementation with probiotics in very-low-birth-weight preterm infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition* 89,1828-1835.
- Sacker, A., Quigley, M. A. & Kelly, Y. J. (2006). Breastfeeding and developmental delay: Findings from the millennium cohort study. *Pediatrics*, 118(3), e682-9.
- Saigal, S., Burrows, E., Stoskopf, B. L., Rosenbaum, P. L. & Streiner, D. (2000). Impact of extreme prematurity on families of adolescent children. *The Journal of Pediatrics*, 137(5), 701-706.
- Saigal, S. & Doyle, L. W. (2008). An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood. *Lancet* 371, 261-269.
- Sakata, H., Yoshioka, H. & Fujita, K. (1985). Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *European Journal of Pediatrics*, 144(2), 186-190.
- Sakurai, M., Itabashi, K., Sato, Y., Hibino, S. & Mizuno, K. (2008). Extrauterine growth restriction in preterm infants of gestational age < or = 32 weeks. *Pediatrics International: Official Journal of the Japan Pediatric Society*, 50(1), 70-75.
- Salah, R. M., Allam, A. M., Magdy, A. M. & Mohamed, A. S. (2013). Bacterial vaginosis and infertility: cause or association? *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 167, 59-63.
- Sanders, M. E., Akkermans, L. M. A., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J., Hörmannspurger, G. et al. (2010). Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes* 1 (3), 164-185.
- Sanz, Y., Collado, M., Haros, M. & Dalmau, J. (2004). Funciones metabólico-nutritivas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: Probióticos y prebióticos. *Acta Pediátrica Española*, 62, 520-526.
- Sari, F. N., Eras, Z., Dizdar, E. A., Erdevé, O., Oguz, S. S., Uras, N. et al. (2012). Do oral probiotics affect growth and neurodevelopmental outcomes in very low-birth-weight preterm infants? *American Journal of Perinatology* 29, 579-586.
- Satokari, R., Grönroos, T., Laitinen, K., Salminen, S. & Isolauri, E. (2009). *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* DNA in the human placenta. *Letters in Applied Microbiology*, 48(1), 8-12.
- Schanler, R. J. (2011). Outcomes of human milk-fed premature infants. *Seminars in Perinatology*, 35(1), 29-33.

- Schanler, R. J., Lau, C., Hurst, N. M. & Smith, E. O. (2005). Randomized trial of donor human milk versus preterm formula as substitutes for mothers' own milk in the feeding of extremely premature infants. *Pediatrics*, 116(2), 400-406.
- Schanler, R. J. & Atkinson, S. A. (1999). Effects of Nutrients in Human Milk on the Recipient Premature Infant. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 4 (3), 297-307.
- Schanler, R. J., Shulman, R. J. & Lau, C. (1999). Feeding strategies for premature infants: Beneficial outcomes of feeding fortified human milk versus preterm formula. *Pediatrics*, 103(6), 1150-1157.
- Schanler, R. J. (2000). Overview: The clinical perspective. *The Journal of Nutrition*, 130(2S Suppl), 417S-419S.
- Schanler, R. J. (2007). Evaluation of the evidence to support current recommendations to meet the needs of premature infants: The role of human milk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(2), 625S-628S.
- Schéle, E., Grahnemo, L., Anesten, F., Hallén, A., Bäckhed, F. & Jansson, J. O. (2015). Regulation of body fat mass by the gut microbiota: Possible mediation by the brain. *Peptides*. Article in press.
- Scher, M. S., Ludington-Hoe, S., Kaffashi, F., Johnson, M. W., Holditch-Davis, D. & Loparo, K. (2009). Neurophysiologic assessment of brain maturation after an 8-week trial of skin-to-skin contact on preterm infants. *Clinical Neurophysiology* 120, 1812-1818.
- Schifano, P., Lallo, A., Asta, F., De Sario, M., Davoli, M. & Michelozzi, P. (2013). Effect of ambient temperature and air pollutants on the risk of preterm birth, Rome 2001-2010. *Environment International* 61, 77-87.
- Schnabl, K. L., Van Aerde, J. E., Thomson, A. B. & Clandinin, M. T. (2008). Necrotizing enterocolitis: A multifactorial disease with no cure. *World Journal of Gastroenterology*, 14(14), 2142-2161.
- Schoenborn, C. A. & Horm, J. (1993). Negative moods as correlates of smoking and heavier drinking: Implications for health promotion. *Advance Data*, 236, 1-16.
- Scholtens, P. A., Oozeer, R., Martin, R., Amor, K. B. & Knol, J. (2012). The early settlers: Intestinal microbiology in early life. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 425-447.
- Schumann, A., Nutton, S., Donnicola, D., Comelli, E. M., Mansourian, R., Cherbut, C., et al. (2005). Neonatal antibiotic treatment alters gastrointestinal tract developmental gene expression and intestinal barrier transcriptome. *Physiological Genomics*, 23(2), 235-245.
- Schwartz, A., Gruhl, B., Lobnitz, M., Michel, P., Radke, M. & Blaut, M. (2003). Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatric Research*, 54(3), 393-399.
- Seliga-Siwecka, J. P. & Kornacka, M. K. (2012). Neonatal outcome of preterm infants born to mothers with abnormal genital tract colonisation and chorioamnionitis: A cohort study. *Early Human Development* 89, 271-275.
- Senterre, T. & Rigo, J. (2011). Optimizing early nutritional support based on recent recommendations in VLBW infants and postnatal growth restriction. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 53(5), 536-542.
- Shah, B. A. & Padbury, J. F. (2014). Neonatal sepsis an old problem with new insights. *Virulence*, 5(1), 170-178.
- Shah, P. S. & Zao, J. (2009). Induced termination of pregnancy and low birthweight and preterm birth: A systematic review and meta-analyses. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 116(11), 1425-1442.
- Shanahan, F. (2004). Host-flora interactions in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 10(7), S16-S24.

- Shane, A. L. & Stoll, B. J. (2014). Neonatal sepsis: Progress towards improved outcomes. *Journal of Infection*, 68, S24-S32.
- Shapiro-Mendoza, C. K., Tomashek, K. M., Kotelchuck, M., Barfield, W., Weiss, J. & Evans, S. (2006). Risk factors for neonatal morbidity and mortality among "Healthy," late preterm newborns. *Seminars in Perinatology* 30, 54-60.
- Shapiro-Mendoza, C. K., Tomashek, K. M., Kotelchuck, M., Barfield, W., Nannini, A., Weiss, J., et al. (2008). Effect of late-preterm birth and maternal medical conditions on newborn morbidity risk. *Pediatrics*, 121(2), e223-32.
- Sharma, R., Young, C. & Neu, J. (2010). Molecular modulation of intestinal epithelial barrier: contribution of microbiota. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010, 1-15.
- Sharon, I., Morowitz, M. J., Thomas, B. C., Costello, E. K., Relman, D. A. & Banfield, J. F. (2013). Time series community genomics analysis reveals rapid shifts in bacterial species, strains, and phage during infant gut colonization. *Genome Research* 23, 111-120.
- Sharps, P. W., Laughon, K. & Giangrande, S. K. (2007). Intimate partner violence and the childbearing year: Maternal and infant health consequences. *Trauma, Violence & Abuse*, 8(2), 105-116.
- Shlomai, N. O., Deshpande, G., Rao, S. & Patole, S. (2014). Probiotics for preterm neonates: What will it take to change clinical practice? *Neonatology* 105, 64-70.
- Siggers, R. H., Siggers, J., Thyman, T., Boye, M. & Sangild, P. T. (2011). Nutritional modulation of the gut microbiota and immune system in preterm neonates susceptible to necrotizing enterocolitis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(6), 511-521.
- Siggers, R. H., Siggers, J., Thyman, T., Boye, M. & Sangild, P. T. (2010). Nutritional modulation of the gut microbiota and immune system in preterm neonates susceptible to necrotizing enterocolitis. *Journal of Nutritional Biochemistry* 22, 511-521.
- Sim, K., Powell, E., Shaw, A. G., McClure, Z., Bangham, M. & Kroll, J. S. (2013). The neonatal gastrointestinal microbiota: The foundation of future health? *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 98(4), F362-4.
- Simonsen, K. A., Anderson-Berry, A. L., Delair, S. F. & Davies, H. D. (2014). Early-onset neonatal sepsis. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(1), 21-47.
- Singer, L. T., Fulton, S., Davillier, M., Koshy, D., Salvator, A. & Baley, J. E. (2003). Effects of infant risk status and maternal psychological distress on maternal-infant interactions during the first year of life. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*, 24(4), 233-241.
- Singer, L. T., Salvator, A., Guo, S., Collin, M., Lilien, L. & Baley, J. (1999). Maternal psychological distress and parenting stress after the birth of a very low-birth-weight infant. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 281(9), 799-805.
- Singhal, A., Cole, T. J. & Lucas, A. (2001). Early nutrition in preterm infants and later blood pressure: Two cohorts after randomised trials. *The Lancet*, 357(9254), 413-419.
- Singhal, A., Cole, T. J., Fewtrell, M., Deanfield, J. & Lucas, A. (2004). Is slower early growth beneficial for long-term cardiovascular health? *Circulation*, 109(9), 1108-1113.
- Sisk, P. M., Lovelady, C. A., Dillard, R. G., Gruber, K. J. & O'Shea, T. M. (2007). Early human milk feeding is associated with a lower risk of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association*, 27(7), 428-433.
- Soilly, A. L., Lejeune, C., Quantin, C., Bejean, S. & Gouyon, J. B. (2014). Economic analysis of the cost associated with prematurity from a literature review. *Public Health* 128 (1), 43-62.
- Soto, A., Martin, V., Jimenez, E., Mader, I., Rodriguez, J. M. & Fernandez, L.

- (2014). Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: Influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Epub ahead of print.
- Spreadbury, I. (2012). Comparison with ancestral diets suggests dense acellular carbohydrates promote an inflammatory microbiota, and may be the primary dietary cause of leptin resistance and obesity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 5, 175-189.
- Steel, J. H., Malatos, S., Kennea, N., Edwards, A. D., Miles, L., Duggan, P. et al. (2005). Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. *Pediatric Research* 57 (3), 404-411.
- Steer, P. (2005). The epidemiology of preterm labour. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 112(Suppl 1), 1-3.
- Stensballe, L. G., Simonsen, J., Jensen, S.M., Bønnelykke, K., Bisgaard, H. (2013). Use of antibiotics during pregnancy increases the risk of asthma in early childhood. *The Journal of Pediatrics* 162, 832-838.
- Stratiki, Z., Costalos, C., Sevastiadou, S. et al. (2007). The effect of a bifidobacter supplemented bovine milk on intestinal permeability of preterm infants. *Early Human Development*, 83, 575-579.
- Stockinger, S., Hornef, M. W. & Chassin, C. (2011). Establishment of intestinal homeostasis during the neonatal period. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(22), 3699-3712.
- Stoll, B. J., Hansen, N. I., Adams-Chapman, I., Fanaroff, A. A., Hintz, S. R., Vohr, B., et al. (2004). Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *The Journal of the American Medical Association*, 292(19), 2357-2365.
- Stoll, B. J., Hansen, N. I., Bell, E. F., Shankaran, S., Laptook, A. R., Walsh, M. C., et al. (2010). Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD neonatal research network. *Pediatrics*, 126(3), 443-456.
- Stout, M., Tuuli, M., Macones, G. & Cahill, A. (2014). Estimation of fetal weight at peri-viable gestational ages: how inaccurate are we and does that impact risk of death? *American Journal of Obstetrics & Gynecology* S56
- Stout, M. J., Conlon, B., Landeau, M., Lee, I., Bower, C., Zhao, Q. et al. (2013). Identification of intracellular bacteria in the basal plate of the human placenta in term and preterm gestations. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 208 (3), 226.e1-226.e7.
- Strand, L. B., Barnett, A. G. & Tong, S. (2011). Maternal Exposure to Ambient Temperature and the Risks of Preterm Birth and Stillbirth in Brisbane, Australia. *American Journal of Epidemiology* 175 (2), 99-107.
- Su, B. H. (2013). Optimizing nutrition in preterm infants. *Pediatrics & Neonatology* 55 (1), 5-13.
- Suzuki, K., Ha, S. A., Tsuji, M. & Fagarasan, S. (2007). Intestinal IgA synthesis: A primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. *Seminars in Immunology*, 19(2), 127-135.
- Swamy, G. K., Ostbye, T. & Skjaerven, R. (2008). Association of preterm birth with long-term survival, reproduction, and next-generation preterm birth. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 299(12), 1429-1436.
- Swiatczak, B. & Rescigno, M. (2012). How the interplay between antigen presenting cells and microbiota tunes host immune responses in the gut. *Seminars in Immunology*, 24(1), 43-49.
- Szylit, O., Maurage, C., Gasqui, P., Popot, F., Favre, A., Gold, F., et al. (1998). Fecal short-chain fatty acids predict digestive disorders in premature infants. *Journal of*

- Parenteral and Enteral Nutrition*, 22(3), 136-141.
- Tagare, A., Kadam, S., Vaidya, U. & Pandit, A. (2010). Routine antibiotic use in preterm neonates: a randomised controlled trial. *Journal of Hospital Infection* 74, 332-326.
- Takahashi, N., Uehara, R., Kobayashi, M., Yadaa, Y., Koikea, Y., Kawamata, R. et al. (2010). Cytokine profiles of seventeen cytokines, growth factors and chemokines in cord blood and its relation to perinatal clinical findings. *Cytokine* 49 (3), 331-337.
- Talge, N. M., Holzman, C., Wang, J., Lucia, V., Gardiner, J. & Breslau, N. (2010). Late-preterm birth and its association with cognitive and socioemotional outcomes at 6 years of age. *Pediatrics*, 126(6), 1124-1131.
- Tanaka, S., Kobayashi, T., Songjinda, P., Tateyama, A., Tsubouchi, M., Kiyohara, C., et al. (2009). Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota. *Immunology and Medical Microbiology*, 56(1), 80-87.
- Tannock, G. W. (1995). Microecology of the gastrointestinal tract in relation to lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 5(8), 1059-1070.
- Tarnow-Mordi, W. O., Darlow, B. & Doyle, L. (2010). Target ranges of oxygen saturation in extremely preterm infants. *The New England Journal of Medicine* 363 (13), 1285.
- Taylor, H. G., Klein, N., Minich, N. M. & Hack, M. (2001). Long-term family outcomes for children with very low birth weights. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 155(2), 155-161.
- Thomas, S. V., Indrani, L., Devi, G. C., Jacob, S., Beegum, J., Jacob, P. P., et al. (2001). Pregnancy in women with epilepsy: Preliminary results of kerala registry of epilepsy and pregnancy. *Neurology India*, 49(1), 60-66.
- Thompson, A. M. & Bizzarro, M. J. (2008). Necrotizing enterocolitis in newborns: Pathogenesis, prevention and management. *Drugs*, 68(9), 1227-1238.
- Thomson, M. (1997). Disorders of the oesophagus and stomach in infants. *Baillieres Clin Gastroenterol* 11 (3), 547-71.
- Tissier, H. (1900). Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (etat normal et pathologique). *University of Paris: Paris, France*.
- Tomicic, S., Johansson, G., Voor, T., Bjorksten, B., Bottcher, M. F. & Jenmalm, M. C. (2010). Breast milk cytokine and IgA composition differ in estonian and swedish mothers-relationship to microbial pressure and infant allergy. *Pediatric Research*, 68(4), 330-334.
- Torloni, M. R., Betrán, A. P., Daher, S., Widmer, M., Dolan, S. M., Menon, R., et al. (2009). Maternal BMI and preterm birth: A systematic review of the literature with meta-analysis. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 22(11), 957-970.
- Torloni, M. R., Fortunato, S. J., Betrán, A. P., Williams, S., Brou, L., Drobek, C. O., et al. (2012). Ethnic disparity in spontaneous preterm birth and maternal pre-pregnancy body mass index. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 285(4), 959-966.
- Torrazza, R. M., Ukhanova, M., Wang, X., Sharma, R., Hudak, M. L., Neu, J., et al. (2013). Intestinal microbial ecology and environmental factors affecting necrotizing enterocolitis. *PloS One*, 8(12), e83304.
- Trevisanuto, D., Doglioni, N., Cavallin, F., Parotto, M., Micaglio, M. & Zanardo, V. (2010). Heat loss prevention in very preterm infants in delivery rooms: A prospective, randomized, controlled trial of polyethylene caps. *The Journal of Pediatrics*, 156(6), 914-917.
- Tsikouras, P., Dafopoulos, A., Trypsianis, G., Vrachnis, N., Bouchlariotou, S., Liatsikos, S. A., et al. (2012). Pregnancies and their obstetric outcome in two selected age groups of teenage women in Greece. *Journal of Maternal-Fetal*

- and Neonatal Medicine, 25(9), 1606-1611.
- Tsui, A. O., McDonald-Mosley, R. & Burke, A. E. (2010). Family planning and the burden of unintended pregnancies. *Epidemiologic Reviews*, 32(1), 152-174.
- Tudehope, D. I. (2013). Human milk and the nutritional needs of preterm infants. *The Journal of Pediatrics*, 162(Suppl 3), S17-S25.
- Tully, D. B., Jones, F. & Tully, M. R. (2001). Donor milk: What's in it and what's not. *Journal of Human Lactation: Official Journal of International Lactation Consultant Association*, 17(2), 152-155.
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E. et al. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457, 480-484.
- Turnbaugh P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R. & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027-1031.
- Turroni, F., Peano, C., Pass, D. A., Foroni, E., Severgnini, M., Claesson, M. J., et al. (2012). Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PloS One*, 7(5), e36957.
- Utrera Torres, M. I., Medina Lopez, C., Vazquez Roman, S., Alonso Diaz, C., Cruz-Rojo, J., Fernández Cooke, E., et al. (2010). Does opening a milk bank in a neonatal unit change infant feeding practices? A before and after study. *International Breastfeeding Journal*, 5(4).
- Vain, N. E. & Barrington, K. J. (2012). Feasibility of evaluating treatment of early hypotension in extremely low birth weight infants. *The Journal of Pediatrics*, 161(1), 4-7.
- Vael, C. & Desager, K. (2009). The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Current Opinion in Pediatrics* 21, 794-800.
- van Beusekom, C. M., Zeegers, T. A., Martini, I. A., Velvis, H. J., Visser, G. H., van Doormaal, J. J., et al. (1993). Milk of patients with tightly controlled insulin-dependent diabetes mellitus has normal macronutrient and fatty acid composition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57(6), 938-943.
- van Nood, E., Vrieze, A., Nieuwdorp, M., Fuentes, S., Zoetendal, E. G., de Vos, W. M., et al. (2013). Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *The New England Journal of Medicine*, 368(5), 407-415.
- Varner, M. W. & Esplin, M. S. (2005). Current understanding of genetic factors in preterm birth. *International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 112 (S1), 28-31.
- Vázquez Román, S., Alonso Díaz, C., Medina López, C., Bustos Lozano, G., Martínez Hidalgo, M. & Pallás Alonso, C. (2009). Puesta en marcha del banco de leche materna donada en una unidad neonatal. *Anales de Pediatría*, 71(4), 343-348.
- Versalovic, J. (2013). The human microbiome and probiotics: implications for pediatrics. *Annals of Nutrition and Metabolism* 63 (S2), 42-52.
- Vicedo-Cabrera, A. M., Iñíguez, C., Barona, C. & Ballester, F. (2014). Exposure to elevated temperatures and risk of preterm birth in Valencia, Spain. *Environment International* 134, 210-217.
- Vitali, B., Cruciani, F., Baldassarre, M. E., Capursi, T., Spisni, E., Valerii, M. C., et al. (2012). Dietary supplementation with probiotics during late pregnancy: Outcome on vaginal microbiota and cytokine secretion. *BMC Microbiology*, 12, 236.
- Voelz, A., Müller, A., Gillen, J., Le, C., Dresbach, T., Engelhart, S. et al. (2010). Outbreaks of *Serratia marcescens* in neonatal and pediatric intensive care units: Clinical aspects, risk factors and management. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 213, 79-87.
- Vogt, S. I., Peña-Díaz, J. & Finlay, B. B. (2015). Chemical communication in the gut: Effects of microbiota-generated metabolites on

- gastrointestinal bacterial pathogens. *Anaerobe*. Article in press.
- Vohr, B. R., Poindexter, B. B., Dusick, A. M., McKinley, L. T., Higgins, R. D., Langer, G. C. et al. (2007). Persistent beneficial effects of breast milk ingested in the neonatal intensive care unit on outcomes of extremely low birth weight infants at 30 months of age. *Pediatrics* 120 (4), e953-9.
- Wadhwa, P. D., Culhane, J. F., Rauh, V. & Barve, S. S. (2001). Stress and preterm birth: Neuroendocrine, immune/inflammatory, and vascular mechanisms. *Maternal and Child Health Journal*, 5(2), 119-125.
- Walker, A. L. & Lawley, T. D. (2013). Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. *Pharmacological Research* 69, 75-86.
- Walker, W. A. (2008). Mechanisms of action of probiotics. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46 (Suppl 2), S87-91.
- Wan, J., Cui, X. W., Zhang, J., Fu, Z. Y., Guo, X. R., Sun, L. J. et al. (2013). Peptidome analysis of human skim milk in term and preterm milk. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 438, 236-241.
- Wang, Y., Hoenig, J. D., Malin, K. J., Qamar, S., Petrof, E. O., Sun, J. et al. (2009). 16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *The ISME Journal* 3 (8), 944-954.
- Wang, Q., Dong, J. & Zhu, Y. (2012). Probiotic supplement reduces risk of necrotizing enterocolitis and mortality in preterm very low-birth-weight infants: An updated meta-analysis of 20 randomized, controlled trials. *Journal of Pediatric Surgery*, 47(1), 241-248.
- Wang, Y. L., Liou, J. D. & Pan, W. L. (2013). Association between maternal periodontal disease and preterm delivery and low birth weight. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology* 52, 71-76.
- Wang L, Yu X, Zhan S, Jia, S. J., Tian, Z. B., Dong, Q. J. et al. (2014). Participation of microbiota in the development of gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology* 20 (17), 4948-4952.
- Ward, R. M. & Beachy, J. C. (2003). Neonatal complications following preterm birth. *International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 110 (S20), 8-16.
- Ward, T. L., Hosid, S., Ioshikhes, I. & Altosaar, I. (2013). Human milk metagenome: A functional capacity analysis. *BMC Microbiology*, 13(1), 116.
- Warinner, C., Speller, C., Collins, M. J. & Lewis Jr, C. M. (2014). Ancient human microbiomes. *Journal of Human Evolution*. Article in press.
- Wasserheit, J. N. & Aral, S. O. (1996). The dynamic topology of sexually transmitted disease epidemics: Implications for prevention strategies. *The Journal of Infectious Diseases*, 174 (Suppl 2), S201-213.
- Weil, O. & Fernández, H. (1999). Is safe motherhood an orphan initiative? *The Lancet*, 354(9182), 940-943.
- Weng, M. & Walker, W. (2013). The role of gut microbiota in programming the immune phenotype. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 4(3), 203-214.
- Westerbeek, E. A., Mørch, E., Lafeber, H. N., Fetter, W. P., Twisk, J. W. & Van Elburg, R. M. (2011). Effect of neutral and acidic oligosaccharides on fecal IL-8 and fecal calprotectin in preterm infants. *Pediatric Research* 69 (3), 255-258.
- Westerbeek, E. A. M., van den Berg, A., Lafeber, H. N., Knol, J., Fetter, W. P. F. & van Elburg, R. M. (2006). The intestinal bacterial colonisation in preterm infants: A review of the literature. *Clinical Nutrition*, 25(3), 361-368.
- Williamson, M. T. & Murti, P. K. (1996). Effects of Storage, Time, Temperature, and Composition of Containers on Biologic Components of Human Milk.

- Journal of Human Lactation* 12, 31-35.
- White, R. A., Bjørnholt, J. V., Baird, D. D., Midtvedt, T., Harris, J. R., Pagano, M., et al. (2013). Novel developmental analyses identify longitudinal patterns of early gut microbiota that affect infant growth. *PLoS Computational Biology*, 9(5), e1003042.
- Whyte, R. K. (2012). Neonatal management and safe discharge of late and moderate preterm infants. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 17, 153-158.
- Wight, N., Morton, J. & Kim, J. (2008). Managing breastfeeding in the NICU. *Best Medicine: Human Milk in the NICU*, 111-135.
- Wilks, M. (2007). Bacteria and early human development. *Early Human Development*, 83(3), 165-170.
- Willems, R. J., Hanage, W. P., Bessen, D. E. & Feil, E. J. (2011). Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Review* 35, 872-900.
- Won, Y. & Rhee, P. L. (2015). The role of microbiota on the gut immunology. *Clinical Therapeutics*. Article in press.
- Woodmansey, E. J. (2007). Intestinal bacteria and ageing. *Journal of Applied Microbiology*, 102(5), 1178-1186.
- Yang, S., Li, W., Challis, J. R., Reid, G., Kim, S. O. & Bocking, A. D. (2014). Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 supernatant prevents lipopolysaccharide-induced preterm birth and reduces inflammation in pregnant CD-1 mice. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, in press.
- Yatsunencko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., et al. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), 222-227.
- Yonkers, K. A., Wisner, K. L., Stewart, D. E., Oberlander, T. F., Dell, D. L., Stotland, N., et al. (2009). The management of depression during pregnancy: A report from the american psychiatric association and the american college of obstetricians and gynecologists. *General Hospital Psychiatry*, 31(5), 403-413.
- Zeitlin, J., Saurel-Cubizolles, M. J., De Mouzon, J., Rivera, L., Ancel, P. Y., Blondel, B., et al. (2002). Fetal sex and preterm birth: Are males at greater risk? *Human Reproduction*, 17(10), 2762-2768.
- Zhang, Z., Adelman, A. S., Rai, D., Boettcher, J. & Lonnerdal, B. (2013). Amino acid profiles in term and preterm human milk through lactation: A systematic review. *Nutrients*, 5(12), 4800-4821.
- Ziegler, E. E. (2011). Meeting the nutritional needs of the low-birth-weight infant. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 58(Suppl 1), 8-18.
- Ziegler, E. E., Thureen, P. J. & Carlson, S. J. (2002). Aggressive nutrition of the very low birthweight infant. *Clinics in Perinatology*, 29(2), 225-244.
- Zoetendal, E. G., von Wright, A., Vilpponen-Salmela, T., Ben-Amor, K., Akkermans, A. D. L. & de Vos, W. M. (2002). Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Applied and Environmental Microbiology* 2002, 3401-3407.
- Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D. & De Vos, W. M. (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 64 (10), 3854-3859.
- Zuckerman, B., Amaro, H., Bauchner, H. & Cabral, H. (1989). Depressive symptoms during pregnancy: Relationship to poor health behaviors. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 160(5), 1107-1111.

XII. Resumen ampliado



XII. 1. INTRODUCCIÓN

La colonización del tracto gastrointestinal es un proceso esencial, ya que las interacciones que se establecen entre microbiota y hospedador tienen importantes consecuencias en la salud (Arrieta et al., 2014; Blaut et al., 2006). La colonización intestinal se inicia en el útero materno, pero aumenta drásticamente durante el parto y los primeros días de vida (DiGiulio et al., 2008; Jiménez et al., 2008; Madan et al., 2012). Este proceso puede verse afectado negativamente por numerosos factores, como el parto por cesárea, la separación temprana de la madre, la alimentación con fórmula, la antibioterapia, las maniobras médicas invasivas y la larga permanencia en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal (UCIN) (Fanaro et al., 2003; Mueller et al., 2015; Murgas et al., 2011; Penders et al., 2006). Muchos de estos factores se asocian con el recién nacido (RN) prematuro, el cual presenta una microbiota intestinal retardada o aberrante, que se caracteriza por una escasa diversidad bacteriana, la abundancia de microorganismos asociados al ambiente hospitalario y la escasa y fluctuante presencia de *Bifidobacterium* en comparación con los recién nacidos a término (Jacquot et al., 2011; Magne et al., 2006; Rougé et al., 2010; Schwiertz et al., 2003; Westerbeek et al., 2006). Durante su habitualmente larga estancia en la UCIN, los RN prematuros están expuestos a bacterias multiresistentes previamente adaptadas al ambiente hospitalario, incluyendo clones de alto riesgo pertenecientes al grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* sp.) (Boucher et al., 2009; Pendleton et al., 2013).

Hasta la fecha, el intestino ha sido objeto de numerosos estudios relacionados con su colonización, mientras que aquellos dirigidos a la microbiota estomacal son relativamente escasos y en su mayoría están centrados en adultos colonizados o no por *Helicobacter* (Abreu et al., 2014; Avilés-Jiménez et al., 2014; Bik et al., 2006; Dicksved et al., 2009; Engstrand et al., 2013; Mattarelli et al., 2014; Okamoto et al., 2014; Wang et al., 2014). El estómago de RN prematuros se caracteriza por la ausencia de una motilidad rítmica o periódica, el lento vaciado gástrico y un pH relativamente alto (5,5-7,0) en comparación con RN a término, hechos que pueden ser determinantes en el establecimiento de la microbiota gástrica (Milisavljevic et al., 2013; Montgomery et al., 1999; Thomson et al., 1997). La alteración de la colonización gastrointestinal que tiene lugar en las primeras semanas de vida puede alterar la función nutricional, inmunológica y de barrera de la microbiota (Hooper et al., 2001; Ley et al., 2006) y, en consecuencia, incrementar la susceptibilidad a padecer enfermedades (Claud et al., 2001; de la Cochetiere et al., 2004).

La lactancia es la forma más natural y recomendable de asegurar el correcto crecimiento y desarrollo de los RN sanos a término (Agostini et al., 2009). Con la apropiada fortificación, la leche humana también es la opción más adecuada para RN de bajo y muy bajo peso al nacer (Lee et al., 2012). Entre los beneficios de la leche humana para los RN prematuros se incluye un vaciado gástrico más rápido (Ewer et al., 1996), mayor tolerancia a la nutrición enteral y menor necesidad de nutrición parenteral (Schanler et al., 2000), mayor absorción de nutrientes (Hamosh, 1994), la mejora en el desarrollo visual y cognitivo (Di Biasie et al., 2006; Hart et al., 2003), y menor incidencia de

enterocolitis necrotizante (NEC), sepsis y otras infecciones (Lucas et al., 1990; Rønnestad et al., 2005). Estos efectos pueden deberse a la acción combinada de los nutrientes y la amplia variedad de factores bioactivos presentes en el calostro y la leche humana, como inmunoglobulinas, células inmunocompetentes, ácidos grasos con actividad antimicrobiana, poliaminas, oligosacáridos, lisozima, lactoferrina y otras glicoproteínas y péptidos antimicrobianos además de bacterias comensales y beneficiosas (Ballard et al., 2013; Fernández et al., 2013; Tudehope et al., 2013). Aunque la edad gestacional puede influir en la concentración de nutrientes y compuestos bioactivos (Koenig et al., 2005; Moltó-Puigmartí et al., 2011; Montagne et al., 1999), los datos clínicos y científicos indican que tanto el calostro como la leche humana proporcionan la mayor protección frente a infecciones al recién nacido inmaduro (Rodríguez et al., 2009). Cuando no se dispone de leche de la propia madre, la leche humana donada es la mejor opción para la alimentación del RN prematuro (Arslanoglu et al., 2013). En la práctica, los prematuros reciben con frecuencia una alimentación mixta, incluyendo cantidades variables de leche de la propia madre, leche donada o fórmula de prematuros, que se administra de forma alternada dependiendo del estado de salud del recién nacido, los protocolos de manejo de cada centro y la disponibilidad de leche de la propia madre durante la estancia en la UCIN. El RN prematuro se alimenta habitualmente mediante sonda hasta que es fisiológicamente maduro para coordinar succión, deglución y respiración, lo cual ocurre entre las semanas 33 y 36 de edad postmenstrual (Nye et al., 2008). Por tanto, cualquier tipo de alimentación se administra mediante la misma sonda, mientras ésta permanece colocada en el neonato. Se ha observado que la porción interna de la sonda nasogástrica es susceptible de colonización por microorganismos asociados a la UCIN (Bussy et al., 1992; Costerton et al., 1999; Hurrell et al., 2009). En consecuencia, el paso de cualquier fuente nutritiva por la sonda puede arrastrar las bacterias de su interior, lo que tiene gran impacto en la colonización gastrointestinal del RN.

Se ha propuesto el uso de probióticos en niños prematuros como una estrategia atractiva para la restauración de la microbiota normal. De hecho, a menudo, su administración reduce las tasas de morbilidad, mortalidad, NEC y sepsis (Deshpande et al., 2010; Embleton et al., 2014; Janvier et al., 2014; Lin et al., 2008; Romeo et al., 2011; Tarnow-Mordi et al., 2010; Wang et al., 2012;). Otros beneficios asociados a la suplementación con probióticos en prematuros son conseguir con mayor rapidez la nutrición enteral total (Romeo et al., 2011), la menor colonización intestinal por *Enterobacteriaceae* (Mohan et al., 2006) y la mejor evolución neurológica e inmunológica (Mohan et al., 2006; Ohashi et al., 2009; Romeo et al., 2011). Todas estas razones han determinado que el número de instituciones que incorporan la suplementación con probióticos de forma rutinaria en el cuidado de RN prematuros esté aumentando rápidamente. Sin embargo, la seguridad de los probióticos en RN de muy bajo o extremadamente bajo peso al nacer es todavía objeto de debate (Millar et al., 2012), los mecanismos que provocan estos efectos todavía no se conocen por completo (van Baarlen et al., 2013), y el establecimiento de conclusiones globales es difícil por la diversidad en cuanto a las cepas probióticas, dosis y periodos de administración empleados en los estudios realizados.

XII. 2. OBJETIVOS

Los principales objetivos de esta Tesis Doctoral son:

1. Evaluar la diversidad bacteriana de una colección de muestras de contenido gástrico, meconio y heces de recién nacidos prematuros durante su permanencia en la UCIN mediante el uso de técnicas dependientes e independientes de cultivo.
2. Caracterizar los grupos bacterianos potencialmente patógenos encontrados de forma mayoritaria en el tracto gastrointestinal de niños prematuros durante su permanencia en la UCIN y a los 2 años de edad.
3. Determinar la composición microbiológica, inmunológica y bioquímica del calostro y la leche de madres de recién nacidos prematuros.
4. Analizar si la administración de *Bifidobacterium breve* PS12929 y *Lactobacillus salivarius* PS12934, dos cepas probióticas aisladas de leche humana, puede modular las características microbiológicas e inmunológicas de recién nacidos de muy bajo y extremadamente bajo peso al nacer.

XII. 3. RESULTADOS

XII. 3. 1. Evaluación de la diversidad bacteriana de meconio y heces de recién nacidos prematuros

El análisis de muestras de meconio y heces obtenidos durante el primer mes de vida de 14 niños prematuros (<1.200 g de peso o <32 semanas de edad gestacional al nacer) se llevó a cabo mediante la aplicación de técnicas de cultivo y el uso de la micromatriz del tracto gastrointestinal humano HITChip (del inglés *Human Intestinal Tract Chip*). Los resultados de las técnicas de cultivo revelaron la dominancia de estafilococos y enterococos en las muestras de heces, mientras que en las de meconio lo hicieron estafilococos y estreptococos; la presencia de lactobacilos y bifidobacterias fue escasa en estas muestras. La colonización del intestino infantil por bacterias Gram-negativas, principalmente representadas por enterobacterias, se inició en la primera semana de vida. Entre los resultados obtenidos con el HITChip destacó la dominancia del filo *Firmicutes* en meconio (63,4%) y la de *Proteobacteria* en heces (57,6%). La clase *Bacilli* fue la dominante entre los miembros del filo *Firmicutes* y su diversidad aumentó progresivamente con el tiempo. Los géneros más abundantes en meconio fueron *Propionibacterium*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*, mientras que en heces predominaron las enterobacterias y los géneros *Enterococcus*, *Bacteroides* o *Clostridium*. Globalmente la correlación entre los resultados obtenidos por ambas técnicas fue buena, aunque la mayor sensibilidad de la micromatriz de DNA permitió observar una mayor diversidad bacteriana.

XII. 3. 2. Papel de las sondas de alimentación enteral en la colonización bacteriana de niños prematuros

Las muestras de heces de 26 niños prematuros y de la leche con la que fueron alimentados (leche de la propia madre, donada o fórmula) durante su estancia hospitalaria fueron recogidas y analizadas utilizando técnicas de cultivo. Las muestras de leche se recogieron tras su paso por la tubuladura que conecta con la sonda nasogástrica. Globalmente se observó el mismo perfil bacteriano, con pequeñas diferencias, en los distintos tipos de alimento. *Staphylococcus* fue el género aislado con mayor frecuencia en las muestras de leche de la propia madre (93%), mientras que el género *Enterococcus* fue el grupo de bacterias Gram-positivas más frecuente en la leche donada y de fórmula (49% y 27%, respectivamente). También se aislaron algunas bacterias Gram-negativas, como *E. coli*, *Klebsiella* spp. o *Serratia* spp., en muestras de los tres tipos de leche. La diversidad bacteriana, estudiada mediante el índice de diversidad de Shannon (SDI), fue mayor en leche de la propia madre ($1,15 \pm 0,09$) que en leche donada o de fórmula ($0,59 \pm 0,11$ y $0,41 \pm 0,06$, respectivamente).

En heces dominaron los mismos géneros bacterianos. Los aislados pertenecientes a los grupos dominantes en todos los tiempos de muestreo (*E. faecalis*, *E. faecium*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*) fueron

genotipados por RAPD (del inglés *Random Amplified Polymorphic DNA*) y PFGE (del inglés *Pulse Field Gel Electrophoresis*). Los resultados muestran que los niños comparten algunas cepas bacterianas, lo que sugiere su origen ambiental. Por otra parte, el análisis de las superficies internas de la tubuladura, conector y sonda nasogástrica mediante microscopía electrónica de barrido reveló la presencia de un biofilm bacteriano en el interior de estos sistemas a partir de 24 h de su colocación; el biofilm observado fue particularmente complejo cuando las sondas habían estado colocadas durante más de 48 h. Por el contrario, tan sólo se observaron restos de leche (pero no bacterias) en la superficie interna de las sondas nasogástricas que se habían empleado durante menos de 12 h.

XII. 3. 3. Caracterización de cepas bacterianas potencialmente patógenas aisladas de niños prematuros y la leche empleada para su alimentación

La mayoría de los aislados bacterianos obtenidos de las muestras comentadas anteriormente pertenecen a especies potencialmente patógenas (*E. faecalis*, n=564; *E. coli*, n=252; *K. pneumoniae*, n=228; *E. faecium*, n=108; *S. aureus*, n=60). En consecuencia, estos aislados se genotiparon (primero por RAPD y posteriormente por PFGE) y un representante de cada perfil de PFGE (*E. faecalis*, n=67; *E. coli*, n=48; *K. pneumoniae*, n=43; *E. faecium*, n=22; *S. aureus*, n=17) se caracterizó en profundidad (tipado por MLST (del inglés *Multi Locus Sequencing Type*) y sensibilidad a antibióticos).

La proporción de clones de alto riesgo detectados en heces de niños prematuros durante su permanencia en la UCIN fue considerable: 5 (ST16-CC8, ST21-CC21, ST40-CC40, ST56-CC30 y ST64-CC8) de 8 ST entre los aislados de *E. faecalis*; 2 (ST18-CC18 y ST132-CC18) de 3 entre los aislados de *E. faecium*; 6 (ST8-CC8, ST30-CC30, 224 ST34-CC30, ST45-CC45, ST121-CC121 y ST1490-CC8) de 7 entre los de *S. aureus*, 5 (ST58, ST59, ST69, ST393 y ST2904) de 10 entre los de *E. coli* y finalmente, 5 (ST25, ST29, ST35, ST45 y ST1547) de 12 entre los de *K. pneumoniae*. Los aislados pertenecientes a estos clones de alto riesgo mostraron resistencia frente a muchos de los antibióticos ensayados y eran portadores de múltiples genes de virulencia.

Entre los aislados de *E. faecalis* y *E. faecium*, se observó una alta tasa de resistencia a antibióticos, especialmente a tetraciclina (96,7% y 97,4%) y eritromicina (68,8% y 92,9%); mientras que sólo algunas cepas de *E. faecium* mostraron resistencia a ampicilina (92,2%). Los genes de virulencia más comunes fueron *gelE* (84,3%), *ccf* (100%) y *efaA_{fs}* (95,7%) en *E. faecalis*, y *eps_{fs}* (24,8%), *gelE* (10,3%) y *ccf* (10,3%) en *E. faecium*. Globalmente, *hld*, *fnbA*, *clfA* e *icaA* fueron los genes de virulencia más frecuentes entre las cepas de *S. aureus*; los aislados de esta especie fueron susceptibles a la mayoría de los antibióticos evaluados. En el caso de los aislados de *E. coli*, se observaron altos porcentajes de resistencia a tetraciclina (46%) y ciprofloxacino (32%). En relación a *K. pneumoniae*, el 21% de los aislados fueron resistentes a tetraciclina mientras que aquellos pertenecientes al subgrupo dominante *K. pneumoniae* ST641 mostraron resistencia a ciprofloxacino, imipenem y cefotaxima.

Por el contrario, la mayoría de las cepas aisladas de heces de estos mismos niños a los 2 años de edad fueron sensibles a los antibióticos estudiados y la proporción de clones de alto riesgo fue escasa: 3 (ST16-CC8, ST40-CC40 y ST64-CC8) de 7 en *E. faecalis*; 5 (ST10-CC10, ST57, ST59, ST69, ST131 y ST3570-CC23) de 10 en *E. coli*, 1 (ST1486-CC292) de 2 en *K. pneumoniae* y, finalmente, ninguno entre las cepas de *E. faecium* y *S. aureus*.

XII. 3. 4. Evaluación de la diversidad bacteriana del contenido gástrico de niños prematuros

Un total de 39 muestras de contenido gástrico de 12 niños prematuros recogidas durante el primer mes de vida se analizó por técnicas de cultivo. Los géneros dominantes fueron *Enterococcus*, *Staphylococcus* y *Lactobacillus*, entre las bacterias Gram-positivas, y *Klebsiella*, *Serratia* y *Escherichia*, entre las Gram-negativas. Todos ellos mostraron tendencia a aumentar tanto en concentración como en frecuencia progresivamente a partir del nacimiento. El perfil bacteriano de estas muestras mostró una gran variabilidad interindividual. Las especies dominantes fueron *E. faecalis* y *S. epidermidis*, seguidas por *S. marcescens*, *E. coli* y *K. pneumoniae*. El análisis de MLST reveló la presencia de 5 clones ST diferentes entre los aislados de *E. faecalis*, 2 entre los de *S. aureus*, 3 entre los de *E. coli* y 2 entre aquellos pertenecientes a *K. pneumoniae*. Curiosamente, todos ellos pertenecientes a complejos clonales de alto riesgo.

Un subconjunto de 15 muestras de contenido gástrico se seleccionó para su análisis por pirosecuenciación. El número total de lecturas obtenido fue de 205101. Tras su análisis se detectaron 8 filos diferentes, pero solo 3 de ellos (*Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*) y 4 clases (*Gammaproteobacteria*, *Bacilli*, *Actinobacteria* y *Alphaproteobacteria*) se encontraron en un porcentaje superior al 0,5% de las lecturas totales. Los géneros dominantes incluían *Serratia* y *Klebsiella* (clase *Gammaproteobacteria*), *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Lactobacillus* (clase *Bacilli*) y *Corynebacterium* (clase *Actinobacteria*).

Las muestras de contenido gástrico se recogieron mediante aspiración por la sonda nasogástrica. Puesto que este paso se comparte con el alimento también se llevó a cabo el estudio de muestras de leche de la propia madre y de leche donada. Globalmente, se observó un alto grado de similitud entre las muestras de contenido gástrico y de alimento a nivel de filo y clase. El análisis detallado de los grupos minoritarios (aquellos presentes en cantidad inferior al 0,5% y en, al menos, dos muestras) mostró marcadas diferencias entre las muestras de contenido gástrico y las de alimento. Tan solo se detectaron secuencias relacionadas con los géneros *Facklamia*, *Kocuria*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Balneimonas*, *Caulobacter*, *Micoplana*, *Halomonas*, *Raoultella*, *Shewanella* y *Mycoplasma* en muestras de contenido gástrico, mientras que los géneros *Dialister* y *Rhizobium* se encontraron exclusivamente en leche.

XII. 3. 5. Composición microbiológica, inmunológica y bioquímica de calostro y leche de madres de niños prematuros

En este estudio participaron un total de 22 mujeres que dieron a luz entre las semanas 24 y 27 de gestación, aportando 17 muestras de calostro y 34 de leche madura. El análisis por cultivo demostró una escasa presencia de bacterias en ambos tipos de muestras. En aquellas muestras en las que se observó crecimiento bacteriano, los recuentos oscilaron entre 2,00 y 3,28 log₁₀ unidades formadoras de colonia (UFC) por mL y entre 2,00 y 4,19 log₁₀ UFC/mL en calostro y leche madura respectivamente. Los principales géneros aislados en las muestras de calostro fueron *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Lactobacillus* mientras que en leche madura se detectaron, además, *Enterococcus* y enterobacterias. La frecuencia de detección de enterococos, lactobacilos y enterobacterias en leche madura fue significativamente mayor que en calostro. El recuento medio de *Staphylococcus* fue mayor en calostro, mientras que el de *Streptococcus* y *Lactobacillus* fue mayor en leche madura, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

La determinación cromatográfica de los principales azúcares presentes en la leche mostró una concentración media (IC 95%) de 56,90 (52,08-61,71) y 62,54 (60,37-64,71) g/L de lactosa, 300,59 (249,70-351,48) y 194,27 (172,51-216,02) mg/L de *myo*-inositol y 109,29 (44,24-154,41) y 588,79 (152,80-845,11) mg/L de glucosa en calostro y leche respectivamente.

El análisis inmunológico reveló la existencia de IL-1b, IL-6, IL-8, GRO- α , MCP-1, MIP-1 β , IL-7, G-CSF y todas las inmunoglobulinas (a excepción de IgG₂) en todas las muestras de calostro. Por el contrario, GM-CSF (en una muestra), IL-2 (en 3 muestras), y IL-10 (en 5 muestras) se encontraron con menor frecuencia en las muestras de calostro. En cuanto a la leche madura también se detectaron todas las inmunoglobulinas excepto IgG₂. Los compuestos IL-8, MCP-1 y MIP-1 β también se detectaron en todas las muestras, mientras que IL-1 β , IL-6, GRO- α , IL-7 y G-CSF estuvieron presentes en todas las muestras excepto una. Sin embargo, no se encontró IgG₂, IFN- γ , IL-2, IL-4 y IL-17 en ninguna de las muestras de leche madura.

XII. 3. 6. Administración de *Bifidobacterium breve* PS12929 y *Lactobacillus salivarius* PS12934, dos cepas probióticas aisladas de leche humana, a recién nacidos de muy bajo y extremadamente bajo peso al nacer: efecto en la modulación microbiológica e inmunológica

En este estudio piloto se incluyeron cinco recién nacidos prematuros (<29 semanas de edad gestacional y/ o <1.300 g de peso al nacer). La dieta de estos niños fue suplementada con *Bifidobacterium breve* PS12929 y *Lactobacillus salivarius* PS12934, dos cepas probióticas aisladas de leche humana. El tratamiento probiótico fue administrado dos veces al día, desde el día 2-4 al día 30 de vida, con una concentración de 10⁹ UFC de cada una de las cepas por dosis. En las muestras fecales, globalmente, predominó el filo *Firmicutes* seguido de *Proteobacteria*. El filo *Actinobacteria*, principalmente representado por el género *Bifidobacterium*, que se aisló a partir del día 7 aunque no en todas las muestras de heces. Entre los *Firmicutes*, los géneros

dominantes fueron *Enterococcus* y *Lactobacillus*. El recuento bacteriano de *Enterococcus* disminuyó significativamente entre los días 7 y 21 de tratamiento ($p = 0,043$) de 10,00 a 8,30 \log_{10} UFC/g. Por el contrario, el recuento de *Lactobacillus* aumentó de 6,60 \log_{10} UFC/g después de 7 días de tratamiento probiótico a 8,32 \log_{10} UFC/g al final de la intervención. El género *Staphylococcus* se aisló principalmente en las primeras semanas de estudio, en las muestras de meconio y heces del día 7 de tratamiento, con recuentos medios de 4,30 y 9,44 \log_{10} UFC/g, respectivamente. En relación al filo *Proteobacteria*, los géneros *Enterobacter* y *Klebsiella* se aislaron de casi todas las muestras de heces. En cuanto al filo *Actinobacteria*, los recuentos medios de *Bifidobacterium* oscilaron entre 7,98 y 9,98 \log_{10} UFC/g. El SDI de las muestras de heces fluctuó notablemente durante el estudio, probablemente a causa de los tratamientos antibióticos recibidos. La detección de *L. salivarius* PS12934 y *B. breve* PS12929 en las heces de los niños se confirmó mediante genotipado por PFGE.

El análisis inmunológico reveló mayores concentraciones de las quimioquinas IL-8 y MCP-1 y de las citoquinas IL-4, IL-10 y IL-13, todas ellas relacionadas con procesos antiinflamatorios, en los niños que reciben el suplemento probiótico que en RN con una edad gestacional de 30–32 semanas; estos niveles eran similares a los de niños mayores de 36 semanas. Estos resultados sugieren que la administración de probióticos puede ejercer un efecto inmunomodulador en estos niños. Por el contrario, la concentración de calprotectina fecal, un biomarcador de inflamación intestinal, disminuyó significativamente a lo largo del tratamiento ($p = 0,041$).

La evolución de la microbiota intestinal de estos cinco niños se evaluó mediante técnicas de secuenciación masiva. Para el análisis del microbioma se seleccionó una muestra de heces de cada niño obtenida antes de iniciar el tratamiento probiótico y heces de semanas posteriores, incluyéndose un total de 14 muestras de heces obtenidas entre el día 7 y los días 21-28 de tratamiento. El número total de secuencias y OTU (del inglés *Operational Taxonomic Units*) fue de 3.500 y 32, respectivamente. Los valores de SDI en las muestras de meconio fueron inferiores a los de heces obtenidas el día 7 de tratamiento o posteriores. Globalmente, *Proteobacteria* fue el filo dominante en las muestras de heces de todos los niños al inicio del tratamiento probiótico, oscilando entre el 69,2% y el 89,2% del total de lecturas. Tras la primera semana de tratamiento, el filo *Firmicutes* aumentó en la mayoría de los niños, alcanzando valores entre el 33,4% y el 74,5% de las lecturas. Sin embargo, el filo *Proteobacteria* tendió a recuperar los valores iniciales en el día 14 de tratamiento. A pesar de la gran variabilidad observada entre los niños, el análisis general reflejó el predominio de las familias *Lactobacillaceae*, *Staphylococcaceae* y *Enterococcaceae* (filo *Firmicutes*) y de *Enterobacteriaceae* y *Moraxellaceae* (filo *Proteobacteria*).

XII. 4. CONCLUSIONES

1. La microbiota gastrointestinal de los niños prematuros muestra un carácter interindividual y fluctuante, dominado por microorganismos asociados con el ambiente hospitalario, incluyendo clones de alto riesgo, mientras que la presencia de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* es escasa.
2. Los sistemas de alimentación enteral utilizados en prematuros pueden ser un importante foco de proliferación de microorganismos asociados al ambiente hospitalario, que pueden contaminar el alimento suministrado y, por tanto, colonizar el tracto gastrointestinal infantil.
3. La microbiota fecal de niños nacidos prematuramente se normaliza a los 2 años de edad, observándose una disminución significativa de la presencia de clones de alto riesgo.
4. La composición bioquímica e inmunológica del calostro y la leche de madres de niños prematuros es particularmente adecuada para los requerimientos nutricionales, de crecimiento y desarrollo de esta población.
5. La administración de *Bifidobacterium breve* PS12929 y *Lactobacillus salivarius* PS12934, dos cepas probióticas aisladas de leche humana, parece ser segura y ejercer efectos beneficiosos en la modulación microbiológica e inmunológica de niños prematuros.

XII. 5. BIBLIOGRAFÍA

Abreu MT, Peek RM. 2014. Gastrointestinal malignancy and the microbiome. *Gastroenterology* 146: 1534-1546.

Agostoni C, Braegger C, Decsi T, Kolacek S, Koletzko B, et al. 2009. Breast-feeding: a commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 49: 112-125.

Arrieta MC, Stiemsma LT, Amenyogbe N, Brown EM, Finlay B. 2014. The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Frontiers in Immunology* 5: 427.

Arslanoglu S, Corpeleijn W, Moro G, Braegger C, Campoy C, et al. 2013. ESPGHAN Committee on Nutrition. Donor human milk for preterm infants: current evidence and research directions. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 57: 535-542.

Avilés-Jimenez F, Vazquez-Jimenez F, Medrano-Guzman R, Mantilla A, Torres J. 2013. Stomach microbiota composition varies between patients with intestinal type of gastric cancer. *Scientific reports* 4: 4202.

van Baarlen P, Wells J. M, Kleerebezem M. 2013. Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli. *Trends in Immunology* 34: 208-215.

Ballard O, Morrow AL. 2013. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatric Clinics of North America* 60: 49-74.

Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson K. E, Purdom E. A, et al. 2006. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *PNAS* 103: 732-737.

Blaut M, Clavel T. 2007. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *Journal of Nutrition* 137: 751S-755S.

Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards J. E, Gilbert D, et al. 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 48: 1-12.

Bussy V, Marechal F, Nasca S. 1992. Microbial contamination of enteral feeding tubes occurring during nutritional treatment. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 16: 552-557.

Claud EC, Walker WA. 2001. Hypothesis: inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis. *The FASEB Journal* 15: 1398-1403.

de la Cochetiere MF, Piloquet H, des Robert C, Darmaun D, Galmiche J, et al. 2004. Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis in

premature infants: The putative role of *Clostridium*. *Pediatric Research* 56: 366-370.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-1322.

Desphande G, Rao S, Patole S, Bulsara M. 2010. Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates. *Pediatrics* 125: 921-930.

Di Biasie A. 2006. Evidence-based review of retinopathy of prematurity prevention in VLBW and ELBW infants. *Neonatal Network* 25: 393-403.

Dicksved J, Lindberg M, Rosenquist M, Enroth H, Jansson J. K, et al. 2009. Molecular characterization of the stomach microbiota in patients with gastric cancer and in controls. *Journal of Medical Microbiology* 58: 509-516.

DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, et al. 2008. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS ONE* 3: e3056.

Embleton N. D, Skeath T. Probiotics for preterm infants on the NICU. *Paediatrics and Child Health* 24: 38-40.

Engstrand L, Lindberg M. 2013. *Helicobacter pylori* and the gastric microbiota. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* 27: 39-45.

Ewer AK, Yu VY. 1996. Gastric emptying in pre-term infants: the effect of breast milk fortifier. *Acta Paediatrica* 85: 1112-1115.

Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. 2003. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatrica* Suppl 91: 48-55.

Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, et al. 2013. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research* 69: 1-10.

Hamosh M. 1994. Digestion in the premature infant: the effects of human milk. *Seminars in Perinatology* 18: 485-494.

Hart S, Boylan LM, Carroll S, Musick YA, Lampe RM. 2003. Brief report: breast-fed one-weekolds demonstrate superior neurobehavioral organization. *Journal of Pediatric Psychology* 28: 529-534.

Hooper LV, Gordon JI. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292: 1115-1118.

Hurrell E, Kucerova E, Loughlin M, Caubilla-Barron J, Hilton A, et al. 2009. Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonisation by members of the *Enterobacteriaceae*. *BMC Infectious Diseases* 9: 2334-2339.

Jacquot A, Neveu D, Aujoulat F, Mercier G, Marchandin H, et al. 2011. Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *Journal of Pediatrics* 158: 390-396.

Janvier A, Malo J, Barrington K. L. 2014. Cohort study of probiotics in a North American neonatal intensive care unit. *Journal of Pediatrics* 164: 980-985.

Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, et al. 2008. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in Microbiology* 159: 187-193.

Koenig A, de Albuquerque Diniz EM, Barbosa SF, Vaz FA. 2005. Immunologic factors in human milk: the effects of gestational age and pasteurization. *Journal of Human Lactation* 21: 439-443.

Lee HC, Kurtin PS, Wight NE, Chance K, Cucinotta-Fobes T, et al. 2012. A quality improvement project to increase breast milk use in very low birth weight infants. *Pediatrics* 130: e1679-1687.

Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. 2006. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444: 1022-1023.

Lin HC, Hsu CH, Chen HL, Chung MY, Hsu JF, et al. 2008. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight preterm infants: a multicenter, randomized, controlled trial. *Pediatrics* 122: 693-700.

Lucas A, Cole TJ. 1990. Breast milk and neonatal necrotizing enterocolitis. *Lancet* 336: 1519-1523.

Madan JC, Salari RC, Saxena D, Davidson L, O'Toole GA, et al. 2012. Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. *Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition* 97: F456-462.

Magne F, Abély M, Boyer F, Morville P, Pochart P, et al. 2006. Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by sequences of 16S rRNA genes and PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles. *FEMS Microbiology Ecology* 57: 128-138.

Mattarelli P, Brandi G, Calabrese C, Fornari F, Prati GM, et al. 2014. Occurrence of *Bifidobacteriaceae* in human hypochlorhydria stomach. *Microbial Ecology in Health & Disease* 25: 21379.

Milisavljevic V, Garg M, Vuletic I, Miller J, Kim L, et al. 2013. Prospective assessment of the gastroesophageal microbiome in VLBW neonates. *BMC Pediatrics* 13: 49.

Millar M, Wilks M, Fleming P, Costeloe K. 2012. Should the use of probiotics in the preterm be routine? *Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition* 97: F70-F74.

Mohan R, Koebnick C, Schildt J, Schmidt S, Mueller M, et al. 2006. Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 4025-4031.

Moltó-Puigmartí C, Castellote AI, Carbonell-Estrany X, López- Sabater MC. 2011. Differences in fat content and fatty acid proportions among colostrum, transitional, and mature milk from women delivering very preterm, preterm, and term infants. *Clinical Nutrition* 30: 116-123.

Montagne P, Cuilliere ML, Mole C, Béné MC, Faure G, et al. 1999. Immunological and nutritional composition of human milk in relation to prematurity and mother's parity during the first 2 weeks of lactation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 29: 75-80.

Montgomery RK, Mulberg AE, Grand RJ. 1999. Development of the human gastrointestinal tract: twenty years of progress. *Gastroenterology* 116: 702-731.

Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, Grigoryan Z, Dominguez-Bello MG. 2015. The infant microbiome development: Mom matters. *Trends in Molecular Medicine* 21: 109-117.

Murgas Torrazza R, Neu J. 2011. The developing intestinal microbiome and its relationship to health and disease in the neonate. *Journal of Perinatology* 31: S29-S34.

Nye C. 2008. Transitioning premature infants from gavage to breast. *Neonatal Network* 27: 7-13.

Ohashi Y, Ushida K. 2009. Health-beneficial effects of probiotics: its mode of action. *Animal Science Journal* 80: 361-371.

Okamoto T, Hayashi Y, Mizuno H, Yanai H, Nishikawa T, et al. 2014. Colonization of an acid resistant *Kingella denitrificans* in the stomach may contribute to gastric dysbiosis by *Helicobacter pylori*. *Journal of Infection and Chemotherapy* 20: 169-174.

Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, et al. 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118: 511-521.

Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. 2013. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 11: 297-308.

Rodríguez NA, Meier PP, Groer MW, Zeller JM. 2009. Oropharyngeal administration of colostrum to extremely low birth weight infants: theoretical perspectives. *Journal of Perinatology* 29: 1-7.

Romeo M. G, Romeo D. M, Trovato L, Oliveri S, Palermo F, et al. 2011. Role of probiotics in the prevention of the enteric colonization by *Candida* in

preterm newborns: Incidence of late-onset sepsis and neurological outcome. *Journal of Perinatology* 31: 63-69.

Rønnestad A, Abrahamsen TG, Medbø S, Reigstad H, Lossius K, et al. 2005. Late-onset septicemia in a Norwegian national cohort of extremely premature infants receiving very early full human milk feeding. *Pediatrics* 115: e269-276.

Rougé C, Goldenberg O, Ferraris L, Berger B, Rochat F, et al. 2010. Investigation of the intestinal microbiota in preterm infants using different methods. *Anaerobe* 16: 362-370.

Schanler RJ. 2000. Overview: the clinical perspective. *Journal of Nutrition* 130: 417-419.

Schwartz A, Gruhl B, Löbnitz M, Michel P, Radke M, et al. 2003. Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatric Research* 54: 393-399.

Tarnow-Mordi W. O, Wilkinson D, Trivedi A, Brok J. 2010. Probiotics reduce all-cause mortality and necrotizing enterocolitis: it is time to change practice. *Pediatrics* 125: 1068-1070.

Thomson M. 1997. Disorders of the oesophagus and stomach in infants. *Bailliere's Clinical Gastroenterology* 11: 547-571.

Tudehope D. I. 2013. Human milk and the nutritional needs of preterm infants. *Journal of Pediatrics* 162: S17-S25.

Wang L, Yu X, Zhan S, Jia S, Tian Z, et al. 2014. Participation of microbiota in the development of gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology* 20: 4948-4952.

Wang Q, Dong J, Zhu Y. 2012. Probiotic supplement reduces risk of necrotizing enterocolitis and mortality in preterm very low-birth-weight infants: an updated meta-analysis of 20 randomized, controlled trials. *Journal of Pediatric Surgery* 47: 241-248.

Westerbeek E, Berg A, Lafeber H, Knol J, Fetter W. P. F, et al. 2006. The intestinal bacterial colonisation in preterm infants: A review of the literature. *Clinical Nutrition* 25: 361-368.

XIII. Extended abstract



XIII. 1. INTRODUCTION

The early colonization of the gastrointestinal tract is an essential process since the interactions established between the microbiota and the host have important consequences for health throughout life (Arrieta et al., 2014; Blaut et al., 2006). Gut colonization starts during the intrauterine stage but increases drastically during delivery and the first days of life (DiGiulio et al., 2008; Jiménez et al., 2008; Madan et al., 2012). This process can be adversely affected by several factors, including delivery by caesarean section, early separation from the mother, formula feeding, antibiotherapy, invasive medical treatments and long stays in neonatal intensive care units (NICU) (Fanaro et al., 2003; Mueller et al., 2015; Murgas et al., 2011; Penders et al., 2006). Most of these factors are associated with premature infants who have a delayed and/or aberrant gut microbiota, which is characterized by a low bacterial diversity, an abundance of microorganisms usually related to hospital environments, and a low and rather fluctuating *Bifidobacterium* population, when compared to term infants (Jacquot et al., 2011; Magne et al., 2006; Rougé et al., 2010; Schwartz et al., 2003; Westerbeek et al., 2006). During their usually long NICU stays, preterm infants are exposed to multi-drug resistant bacteria previously adapted to the hospital environment, including high-risk clones belonging to the ESKAPE group (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* sp.) (Boucher et al., 2009; Pendleton et al., 2013).

Up to the present, gut has been the subject of most studies concerning gastrointestinal colonization while studies dealing with the stomach microbiota are relatively scarce and, most of them, focused on adults, with or without *Helicobacter* colonization (Abreu et al., 2014; Avilés-Jiménez et al., 2014; Bik et al., 2006; Dicksved et al., 2009; Engstrand et al., 2013; Mattarelli et al., 2014; Okamoto et al., 2014; Wang et al., 2014). In comparison to term neonates, the preterm stomach is characterized by absence of periodical or rhythmic motility, a slow gastric emptying and a relatively high gastric pH (5.5-7.0), facts that can be determinant in the establishment of the gastric microbiota (Milisavljevic et al., 2013; Montgomery et al., 1999; Thomson et al., 1997). This abnormal gastrointestinal colonization during the first weeks of life may alter the barrier, nutritional and immunological functions of the host microbiota (Hooper et al., 2001; Ley et al., 2006) and, as a consequence, increases susceptibility to disease (Claud et al., 2001; de la Cochetiere et al., 2004).

Breastfeeding is the natural and best advisable way of supporting the growth and development of healthy term infants (Agostini et al., 2009) and, with appropriate fortification, human milk is also the optimal feeding option for low- and very low-birth weight infants (Lee et al., 2012). The benefits of breast milk for preterm infants include faster gastric emptying (Ewer et al., 1996), a faster tolerance to enteral feeding, and a reduced need of parental nutrition

(Schanler et al., 2000), enhanced nutrient absorption (Hamosh, 1994), improved visual and cognitive development (Di Biasie et al., 2006; Hart et al., 2003), and a reduced incidence of necrotizing enterocolitis, sepsis and other infections (Lucas et al., 1990; Rønnestad et al., 2005). Such effects are probably because of the combined action of nutrients and a wide variety of bioactive factors present in human colostrum and milk, such as immunoglobulins, immunocompetent cells, antimicrobial fatty acids, polyamines, oligosaccharides, lysozyme, lactoferrin, and other glycoproteins, antimicrobial peptides and, also, commensal or beneficial bacteria (Ballard et al., 2013; Fernández et al., 2013; Tudehope et al., 2013). Although gestational age may influence the concentration of nutrients and bioactive compounds (Koenig et al., 2005; Moltó-Puigmarí et al., 2011; Montagne et al., 1999), both clinical and scientific data indicate that colostrum and milk provides the highest level of protection against infection to immature infants (Rodríguez et al., 2009). When own mother's milk (OMM) is not available, donor human milk (DM) becomes the next feeding option (Arslanoglu et al., 2013). In practice, preterm neonates frequently receive a mixed diet regime, including alternating and variable amounts of OMM, DM and/or preterm infant formula (PF), depending on their health status, internal hospital management and availability of human milk during their stay at the NICU. Preterm infants are routinely tube-fed until they are physiologically ready for coordination of sucking, swallowing and breathing, which often occurs at 33-36 weeks of postmenstrual age (Nye et al., 2008). Therefore, any type of feed must be applied through a feeding device. The inner portion of nasogastric enteral feeding tubes (NEFT) has been shown to be important locus for colonization by NICU-associated microorganisms (Bussy et al., 1992; Costerton et al., 1999; Hurrell et al., 2009). As a consequence, the pass of any nutritional source through the tubes may sweep along bacteria and have a strong impact on the infant gastrointestinal colonization.

The use of probiotics has been proposed as an attractive strategy to restore the normal gut microbiota in preterm infants. In fact, probiotic administration to this population often leads to a decrease in the rates of morbidity, mortality, NEC and sepsis (Deshpande et al., 2010; Embleton et al., 2014; Janvier et al., 2014; Lin et al., 2008; Romeo et al., 2011; Tarnow-Mordi et al., 2010; Wang et al., 2012). Additional benefits associated with probiotic supplementation in preterm neonates include earlier achievement of full enteral feeding (Romeo et al., 2011), a lower colonization by *Enterobacteriaceae* (Mohan et al., 2006), and a better neurological and immunological evolution (Mohan et al., 2006; Ohashi., 2009; Romeo et al., 2011). For these reasons, the number of institutions including probiotic supplementation in routine preterm care is increasing rapidly; however, the safety of probiotics in very low and extremely low birth weight infants is still a matter of debate (Millar et al., 2012), the mechanisms backing such effects are not well known yet (van Baarlen et al., 2013), and global conclusions are

difficult to establish because different studies usually make use of different probiotic strains, dosages, and/or treatment period.

XIII. 2. OBJECTIVES

The main objectives of this PhD Thesis were:

1. To evaluate the bacterial diversity in a collection of samples of gastric content, meconium and feces obtained from preterm infants during their NICU stay using culture-dependent and -independent techniques.
2. To characterize the main potentially pathogenic bacterial groups present in the gastrointestinal tract of premature infants during their NICU stay and, also, when they were 2-year-old.
3. To determine the microbiological, immunological and biochemical composition of colostrum and milk from mothers of preterm neonates.
4. To analyze if the administration of *Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934, two probiotic strains isolated from human milk, was able to exert microbiological and immunological modulatory effects in very low and extremely low-birth weight infants.

XIII. 3. RESULTS

XIII. 3. 1. Assessment of the bacterial diversity in meconium and feces of preterm infants

The analysis of meconium and fecal samples from 14 preterms infants (<1,200 g birth weight or <32 gestational age at birth) during their first month of life was performed by culture techniques and, also, by using the Human Intestinal Tract Chip (HITChip) microarray. Culture analysis revealed staphylococci and enterococci as the dominant bacterial groups in the fecal samples while staphylococci and streptococci were dominant in the meconium ones. Lactobacilli and bifidobacteria were scarce in the analyzed samples while Gram-negative bacteria, mainly represented by enterobacteria, colonized the infants' gut after the first week of life. The main results obtained by HITChip were the dominance of the *Firmicutes* phylum in the meconium samples (63.4%) while *Proteobacteria* were dominant in the fecal ones (57.6%). *Firmicutes* was predominantly represented by the Class *Bacilli* although the diversity within this phylum increased along time. Some genus-like groups were more abundant in meconium (*Propionibacterium*, *Lactobacillus* or *Streptococcus*) and others (enterobacteria, *Enterococcus*, *Bacteroides* or *Clostridium*) in feces. Globally, there was a good correlation between the results obtained by the two approaches, although the DNA microarray was more sensitive and led to the detection of a higher bacterial diversity.

XIII. 3. 2. Role of the feeding tubes in the bacterial colonization of preterm infants

Feces from 26 preterm infants and samples of the foods used to feed them (OMM, DM and PF) were collected during their hospital stay and analysed by culture methods. Feeding samples were taken after their pass through the external feeding tube (EFT) that connects with the NEFT. Globally, the same bacterial profile, with minor differences, could be observed in the three different feed types. *Staphylococcus* was the genus most frequently isolated from OMM samples (93%), while *Enterococcus* was the Gram-positive genus most frequently found in DM and PF samples (49% and 27%, respectively). Some Gram-negative bacteria, such as *E. coli*, *Klebsiella* spp. or *Serratia* spp., were also isolated from the three feed types. The diversity present in OMM (1.15 ± 0.09) samples was higher than that observed in those of DM and PF (0.59 ± 0.11 and 0.41 ± 0.06 , respectively).

The same dominant genera were detected in fecal samples. The isolates belonging to the most frequently detected species in all the samples and sampling points (*E. faecalis*, *E. faecium*, *S. epidermidis*, *S. aureus* and *K.*

pneumoniae) were genotyped by RAPD and PFGE profiling. The results showed that different preterm infants were sharing some bacterial strains, a fact that suggested their environmental origin. On the other hand, the analysis of the inner surfaces of the EFTs and connectors by scanning electron microscopy (SEM) revealed the existence of a bacterial biofilm inside those EFTs and connectors used for, at least, 24 h; the biofilm was particularly complex and thick in those used for more than 48 h. In contrast, only milk residues (but no bacteria) could be observed in the inner surfaces of those NEFTs that were placed for less than 12 h.

XIII. 3. 3. Characterization of the potentially pathogenic bacterial strains isolated from the preterm and feeding samples

Most bacterial isolates obtained from the samples cited above belonged to potentially pathogenic species (*E. faecalis*, n=564; *E. coli*, n=252; *K. pneumoniae*, n=228; *E. faecium*, n=108; *S. aureus*, n=60). Subsequently, the isolates were genotyped (first by RAPD and, later, by PFGE profiling) and one representative of each PFGE profile (*E. faecalis*, n=67; *E. coli*, n=48; *K. pneumoniae*, n=43; *E. faecium*, n=22; *S. aureus*, n=17) was further characterized (MLST typing and antibiotic susceptibility).

The proportion of the high-risk clones detected in the faecal samples during the NICU admittance was considerable: 5 (ST16-CC8, ST21-CC21, ST40-CC40, ST56-CC30 and ST64-CC8) out of the 8 STs found among the *E. faecalis* isolates; 2 (ST18-CC18 and ST132-CC18) out of 3 among the *E. faecium* ones; 6 (ST8-CC8, ST30-CC30, 224 ST34-CC30, ST45-CC45, ST121-CC121, and ST1490-CC8) out of 7 among the *S. aureus* ones, 5 (ST58, ST59, ST69, ST393, ST2904) out of 10 among the *E. coli* ones and, finally, 5 (ST25, ST29, ST35, ST45, and ST1547) out of 12 among the *K. pneumoniae* ones. Isolates belonging to these high-risk clones exhibited resistance to many of the studied antibiotics and carried multiple virulence factors.

Among the *E. faecalis* and *E. faecium* isolates, a high level of antibiotic resistance was observed, especially for tetracycline (96.7% and 97.4%) and erythromycin (68.8% and 92.9%); whereas ampicillin resistance was only detected among the *E. faecium* strains (92.2%). The most common virulence genes were *gelE* (84.3%), *ccf* (100%) and *efaA_{fs}* (95.7%) in *E. faecalis*, and *eps_{fs}* (24.8%), *gelE* (10.3%) and *ccf* (10.3%) in *E. faecium*. Globally, *hld*, *fnbA*, *clfA*, and *icaA* were the most frequent virulence genes among the *S. aureus* strains, which were susceptible to most of the evaluated antibiotics. In the case of the *E. coli* isolates, high percentages of resistance to tetracycline (46%) and ciprofloxacin (32%) were observed. In relation to *K. pneumoniae*, 21% of the isolates were resistant to tetracycline while those belonging to the predominant

K. pneumoniae ST641 subgroup displayed resistance to ciprofloxacin, imipenem and cefotaxime.

In contrast, strains isolated from faecal samples collected when the same infants were 2-year-old were very susceptible to the tested antibiotics and the proportion of high-risk clones was reduced: 3 (ST16-CC8, ST40-CC40, and ST64-CC8) out of 7 in *E. faecalis*; 5 (ST10-CC10, ST57, ST59, ST69, ST131, and ST3570-CC23) out of 10 in *E. coli*, 1 (ST1486-CC292) out of 2 in *K. pneumoniae* and, finally, none among the *E. faecium* and *S. aureus* strains.

XIII. 3. 4. Assessment of the bacterial diversity in the gastric content of preterm infants

A total of 39 samples of gastric content collected during the first month of life of 12 preterm infants were analyzed by culture-based methods. The dominant bacterial genera were *Enterococcus*, *Staphylococcus* and *Lactobacillus*, among Gram-positive bacteria, and *Klebsiella*, *Serratia* and *Escherichia*, among the Gram-negative ones. All of them showed a trend to increase, both in concentration and frequency, from birth onwards. The bacterial profiles showed a high inter-individual variability. The dominant species were *E. faecalis* and *S. epidermidis*, followed by *S. marcescens*, *E. coli* and *K. pneumoniae*. MLST analysis revealed the presence of 5 different ST clones among the *E. faecalis* strains, 2 among the *S. aureus* ones, 3 among the *E. coli* ones and 2 among those belonging to the species *K. pneumoniae*. Interestingly, all of them belonged to high-risk clonal complexes.

A subset of 15 gastric content samples was selected for the pyrosequencing analysis. The total number of reads was 205,101. Eight different phyla could be detected in the analyzed samples although only 3 phyla (*Proteobacteria*, *Firmicutes* and *Actinobacteria*) and 4 classes (*Gammaproteobacteria*, *Bacilli*, *Actinobacteria* and *Alphaproteobacteria*) were present in a percentage higher than 0.5% of the total reads. Dominant genera included *Serratia* and *Klebsiella* (class *Gammaproteobacteria*), *Streptococcus*, *Staphylococcus* and *Lactobacillus* (class *Bacilli*), and *Corynebacterium* (class *Actinobacteria*).

Gastric content samples were collected through the nasogastric tubes by syringe aspiration. Since this route was shared with OMM or DM samples, analyses of feeding samples were also performed. Globally, a high degree of similarity between gastric and milk samples was observed at the phylum and class levels. A detailed analysis of the minority bacterial groups (those found in a percentage minor than 0.5% and present in, at least, two samples) was also carried out. The phyla composition of minority groups in the gastric content samples was notably different to that found in the feeding samples. Sequences

related to the genera *Facklamia*, *Kocuria*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Balneimonas*, *Caulobacter*, *Micoplana*, *Halomonas*, *Raoultella*, *Shewanella* and *Mycoplasma* were only present in gastric content samples while those belonging to the genera *Dialister* and *Rhizobium* were exclusively found in milk samples.

XIII. 3. 5. Microbiological, immunological and biochemical composition of colostrum and milk from mothers of preterm neonates

A total of 22 women, who delivered preterm infants between the 24 and 27 weeks of gestation, participated in this study, providing 17 colostrum and 34 mature milk samples. Culture analysis revealed a low bacterial detection in both types of samples. When bacterial growth was detected, the bacterial counts oscillated between 2.00 and 3.28 log₁₀ CFU/mL and between 2.00 and 4.19 log₁₀ CFU/mL in colostrum and mature milk samples, respectively. The main genera isolated from colostrum were *Staphylococcus*, *Streptococcus*, and *Lactobacillus* whereas, in addition to these genera, *Enterococcus* and enterobacteria were also among the main microorganisms isolated from mature milk. The detection frequencies of enterococci, lactobacilli, and enterobacteria in the mature milk samples were statistically higher than in the colostrum ones. The mean value for staphylococci counts was higher in colostrum whereas those for streptococci and lactobacilli were higher in mature milk; however, such differences did not reach a statistically significant level.

The chromatographic determination of the main sugars in milk showed mean (95% CI) concentration values of 56.90 (52.08–61.71) and 62.54 (60.37–64.71) g/L of lactose, 300.59 (249.70–351.48) and 194.27 (172.51–216.02) mg/L of *myo*-inositol and 109.29 (44.24–154.41) and 588.79 (152.80–845.11) mg/L of glucose in the colostrum and the milk samples, respectively.

Immunological assays showed that IL-1b, IL-6, IL-8, GRO- α , MCP-1, MIP-1 β , IL-7, G-CSF and all the immunoglobulins (with the exception of IgG₂) could be detected in all the colostrum samples. In contrast, GM-CSF (1 sample), IL-2 (3 samples), and IL-10 (5 samples) showed the lowest detection frequencies among the colostrum samples. In relation to mature milk, all the immunoglobulins were also detected in all the samples with the exception, again, of IgG₂. On the other hand, IL-8, MCP-1, and MIP-1 β could also be detected in all the samples, whereas in the case of IL-1 β , IL-6, GRO- α , IL-7, and G-CSF, there was only a single sample in which these compounds could not be detected. In addition, IgG₂, IFN- γ , IL-2, IL-4, and IL-17 were not detected in any mature milk sample.

XIII. 3. 6. Administration of *Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934, two probiotic strains isolated from human milk, to very low and extremely low-birth weight infants: microbiological and immunological modulatory effects

Five preterm infants (gestational age <29 weeks and/or a birth weight <1,300 g) were enrolled in this pilot study. The infants' diet was supplemented with *Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934, two probiotic strains isolated from human milk. Probiotic treatment was administrated twice a day from day 2-4 to day 30 of life at a concentration of 10^9 CFU of each strain per dose. Globally, the phylum *Firmicutes* followed by *Proteobacteria* predominated in the fecal samples. The phylum *Actinobacteria*, mainly represented by the genus *Bifidobacterium*, was isolated from day 7 although not in all the fecal samples. Among the *Firmicutes*, the genera *Enterococcus* and *Lactobacillus* were the dominant ones. The bacterial counts of *Enterococcus* decreased significantly from day 7 to day 21 of treatment ($p = 0.043$) from 10.00 to 8.30 \log_{10} CFU/g. In contrast, *Lactobacillus* counts increased from 6.60 \log_{10} CFU/g after 7 days of probiotic treatment to 8.32 \log_{10} CFU/g at the end of the intervention. The genus *Staphylococcus* was mainly isolated in the first weeks of the study from meconium and 7-day fecal samples with median counts of 4.30 and 9.44 \log_{10} CFU/g, respectively. In relation to *Proteobacteria*, the genera *Enterobacter* and *Klebsiella* were isolated from almost all the fecal samples. Regarding *Actinobacteria*, *Bifidobacterium* median counts oscillated between 7.98 and 9.98 \log_{10} CFU/g. The Shannon Diversity Index (SDI) of the fecal samples fluctuated during the study probably due to the different antibiotic treatments that the infants received. Detection of *L. salivarius* PS12934 and *B. breve* PS12929 in feces was confirmed by PFGE genotyping.

The immunological analysis revealed that the concentrations of the chemokines IL-8 and MCP-1 and those of the cytokines IL-4, IL-10, and IL-13, which are related to anti-inflammatory processes, in the treated infants were higher than those reported for preterm neonates born at 30–32 weeks and similar to those found in older infants (>36 weeks). This suggests that the administration of the probiotic strains may exert an immunomodulatory effect on these infants. In contrast, the concentration of calprotectin, an inflammatory biomarker, decreased significantly along the sampling time ($p = 0.041$).

The evolution of the gut microbiota of these five preterm infants was determined by next generation sequencing using a metagenomic approach. One fecal sample of each infant was collected before starting the probiotic treatment and, then, a subset of fecal samples ($n=14$) from day 7 to day 21-28 of treatment was selected for microbiome analysis. The average number of total sequences and OTU's per sample was 3,500 and 32, respectively. SDI showed a small reduction of the bacterial diversity from meconium samples to feces obtained at day 7 of treatment and, then, an increasing trend during the

following weeks. Globally, *Proteobacteria* was the dominant phylum in all the infants at the beginning of the probiotic treatment, ranging from 69.2% to 89.2% of the total reads. After the first week of treatment, *Firmicutes* increased in most of the samples, reaching values ranging between 33.4% and 74.5% of the reads. However, *Proteobacteria* tended to recover its initial values at day 14 of treatment. Despite the high variability observed between infants, a general analysis at the family level reflected a predominance of *Lactobacillaceae*, *Staphylococcaceae* and *Enterococcaceae* (phylum *Firmicutes*) and *Enterobacteriaceae* and *Moraxellaceae* (phylum *Proteobacteria*).

XIII. 4. CONCLUSIONS

1. The gastrointestinal microbiota of preterm infant shows a fluctuating and interindividual character but, globally, it is dominated by hospital-associated microorganisms, including high-risk clones, while the presence of members of the genera *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* is scarce.
2. The preterm feeding systems can be important loci for the proliferation of hospital-associated microorganisms, which can contaminate the foods that are administered through such devices and, subsequently, colonize the infants' gastrointestinal tract.
3. The fecal microbiota of infants that were born preterm becomes normalized when they are 2-year-old, including a significantly reduction in the presence of high-risk clones.
4. The biochemical and immunological composition of the colostrum and milk of women delivering preterm infants is particularly suited for the nutritional, growth and development requirements of such a population.
5. The administration of *Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934, two probiotic strains isolated from human milk, seems to be safe and to exert beneficial microbiological and immunological effects in preterm infants.

XIII. 5. REFERENCES

Abreu MT, Peek RM. 2014. Gastrointestinal malignancy and the microbiome. *Gastroenterology* 146: 1534-1546.

Agostoni C, Braegger C, Decsi T, Kolacek S, Koletzko B, et al. 2009. Breast-feeding: a commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 49: 112-125.

Arrieta MC, Stiemsma LT, Amenyogbe N, Brown EM, Finlay B. 2014. The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Frontiers in Immunology* 5: 427.

Arslanoglu S, Corpeleijn W, Moro G, Braegger C, Campoy C, et al. 2013. ESPGHAN Committee on Nutrition. Donor human milk for preterm infants: current evidence and research directions. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 57: 535-542.

Avilés-Jimenez F, Vazquez-Jimenez F, Medrano-Guzman R, Mantilla A, Torres J. 2013. Stomach microbiota composition varies between patients with intestinal type of gastric cancer. *Scientific reports* 4: 4202.

van Baarlen P, Wells J. M, Kleerebezem M. 2013. Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli. *Trends in Immunology* 34: 208-215.

Ballard O, Morrow AL. 2013. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatric Clinics of North America* 60: 49-74.

Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson K. E, Purdom E. A, et al. 2006. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *PNAS* 103: 732-737.

Blaut M, Clavel T. 2007. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *Journal of Nutrition* 137: 751S-755S.

Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards J. E, Gilbert D, et al. 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 48: 1-12.

Bussy V, Marechal F, Nasca S. 1992. Microbial contamination of enteral feeding tubes occurring during nutritional treatment. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 16: 552-557.

Claud EC, Walker WA. 2001. Hypothesis: inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis. *The FASEB Journal* 15: 1398-1403.

- de la Cochetiere MF, Piloquet H, des Robert C, Darmaun D, Galmiche J, et al. 2004. Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis in premature infants: The putative role of *Clostridium*. *Pediatric Research* 56: 366-370.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-1322.
- Desphande G, Rao S, Patole S, Bulsara M. 2010. Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates. *Pediatrics* 125: 921-930.
- Di Biasie A. 2006. Evidence-based review of retinopathy of prematurity prevention in VLBW and ELBW infants. *Neonatal Network* 25: 393-403.
- Dicksved J, Lindberg M, Rosenquist M, Enroth H, Jansson J. K, et al. 2009. Molecular characterization of the stomach microbiota in patients with gastric cancer and in controls. *Journal of Medical Microbiology* 58: 509-516.
- DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, et al. 2008. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS ONE* 3: e3056.
- Embleton N. D, Skeath T. Probiotics for preterm infants on the NICU. *Paediatrics and Child Health* 24: 38-40.
- Engstrand L, Lindberg M. 2013. *Helicobacter pylori* and the gastric microbiota. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* 27: 39-45.
- Ewer AK, Yu VY. 1996. Gastric emptying in pre-term infants: the effect of breast milk fortifier. *Acta Paediatrica* 85: 1112-1115.
- Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. 2003. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatrica* Suppl 91: 48-55.
- Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, et al. 2013. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research* 69: 1-10.
- Hamosh M. 1994. Digestion in the premature infant: the effects of human milk. *Seminars in Perinatology* 18: 485-494.
- Hart S, Boylan LM, Carroll S, Musick YA, Lampe RM. 2003. Brief report: breast-fed one-weekolds demonstrate superior neurobehavioral organization. *Journal of Pediatric Psychology* 28: 529-534.

Hooper LV, Gordon JI. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292: 1115-1118.

Hurrell E, Kucerova E, Loughlin M, Caubilla-Barron J, Hilton A, et al. 2009. Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonisation by members of the *Enterobacteriaceae*. *BMC Infectious Diseases* 9: 2334-2339.

Jacquot A, Neveu D, Aujoulat F, Mercier G, Marchandin H, et al. 2011. Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *Journal of Pediatrics* 158: 390-396.

Janvier A, Malo J, Barrington K. L. 2014. Cohort study of probiotics in a North American neonatal intensive care unit. *Journal of Pediatrics* 164: 980-985.

Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, et al. 2008. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in Microbiology* 159: 187-193.

Koenig A, de Albuquerque Diniz EM, Barbosa SF, Vaz FA. 2005. Immunologic factors in human milk: the effects of gestational age and pasteurization. *Journal of Human Lactation* 21: 439-443.

Lee HC, Kurtin PS, Wight NE, Chance K, Cucinotta- Fobes T, et al. 2012. A quality improvement project to increase breast milk use in very low birth weight infants. *Pediatrics* 130: e1679-1687.

Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. 2006. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444: 1022-1023.

Lin HC, Hsu CH, Chen HL, Chung MY, Hsu JF, et al. 2008. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight preterm infants: a multicenter, randomized, controlled trial. *Pediatrics* 122: 693-700.

Lucas A, Cole TJ. 1990. Breast milk and neonatal necrotizing enterocolitis. *Lancet* 336: 1519-1523.

Madan JC, Salari RC, Saxena D, Davidson L, O'Toole GA, et al. 2012. Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. *Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition* 97: F456-462.

Magne F, Abély M, Boyer F, Morville P, Pochart P, et al. 2006. Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by sequences of 16S rRNA genes and PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles. *FEMS Microbiology Ecology* 57: 128-138.

Mattarelli P, Brandi G, Calabrese C, Fornari F, Prati GM, et al. 2014. Occurrence of *Bifidobacteriaceae* in human hypochlorhydria stomach. *Microbial Ecology in Health & Disease* 25: 21379.

- Milisavljevic V, Garg M, Vuletic I, Miller J, Kim L, et al. 2013. Prospective assessment of the gastroesophageal microbiome in VLBW neonates. *BMC Pediatrics* 13: 49.
- Millar M, Wilks M, Fleming P, Costeloe K. 2012. Should the use of probiotics in the preterm be routine? *Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition* 97: F70-F74.
- Mohan R, Koebnick C, Schildt J, Schmidt S, Mueller M, et al. 2006. Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 4025-4031.
- Moltó-Puigmartí C, Castellote Al, Carbonell-Estrany X, López- Sabater MC. 2011. Differences in fat content and fatty acid proportions among colostrum, transitional, and mature milk from women delivering very preterm, preterm, and term infants. *Clinical Nutrition* 30: 116-123.
- Montagne P, Cuilliere ML, Mole C, Béné MC, Faure G, et al. 1999. Immunological and nutritional composition of human milk in relation to prematurity and mother's parity during the first 2 weeks of lactation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 29: 75-80.
- Montgomery RK, Mulberg AE, Grand RJ. 1999. Development of the human gastrointestinal tract: twenty years of progress. *Gastroenterology* 116: 702-731.
- Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, Grigoryan Z, Dominguez-Bello MG. 2015. The infant microbiome development: Mom matters. *Trends in Molecular Medicine* 21: 109-117.
- Murgas Torrazza R, Neu J. 2011. The developing intestinal microbiome and its relationship to health and disease in the neonate. *Journal of Perinatology* 31: S29-S34.
- Nye C. 2008. Transitioning premature infants from gavage to breast. *Neonatal Network* 27: 7-13.
- Ohashi Y, Ushida K. 2009. Health-beneficial effects of probiotics: its mode of action. *Animal Science Journal* 80: 361-371.
- Okamoto T, Hayashi Y, Mizuno H, Yanai H, Nishikawa T, et al. 2014. Colonization of an acid resistant *Kingella denitrificans* in the stomach may contribute to gastric dysbiosis by *Helicobacter pylori*. *Journal of Infection and Chemotherapy* 20: 169-174.

Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, et al. 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118: 511-521.

Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. 2013. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 11: 297-308.

Rodríguez NA, Meier PP, Groer MW, Zeller JM. 2009. Oropharyngeal administration of colostrum to extremely low birth weight infants: theoretical perspectives. *Journal of Perinatology* 29: 1-7.

Romeo M. G, Romeo D. M, Trovato L, Oliveri S, Palermo F, et al. 2011. Role of probiotics in the prevention of the enteric colonization by *Candida* in preterm newborns: Incidence of late-onset sepsis and neurological outcome. *Journal of Perinatology* 31: 63-69.

Rønnestad A, Abrahamsen TG, Medbø S, Reigstad H, Lossius K, et al. 2005. Late-onset septicemia in a Norwegian national cohort of extremely premature infants receiving very early full human milk feeding. *Pediatrics* 115: e269-276.

Rougé C, Goldenberg O, Ferraris L, Berger B, Rochat F, et al. 2010. Investigation of the intestinal microbiota in preterm infants using different methods. *Anaerobe* 16: 362-370.

Schanler RJ. 2000. Overview: the clinical perspective. *Journal of Nutrition* 130: 417-419.

Schwartz A, Gruhl B, Löbnitz M, Michel P, Radke M, et al. 2003. Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatric Research* 54: 393-399.

Tarnow-Mordi W. O, Wilkinson D, Trivedi A, Brok J. 2010. Probiotics reduce all-cause mortality and necrotizing enterocolitis: it is time to change practice. *Pediatrics* 125: 1068-1070.

Thomson M. 1997. Disorders of the oesophagus and stomach in infants. *Bailliere's Clinical Gastroenterology* 11: 547-571.

Tudehope D. I. 2013. Human milk and the nutritional needs of preterm infants. *Journal of Pediatrics* 162: S17-S25.

Wang L, Yu X, Zhan S, Jia S, Tian Z, et al. 2014. Participation of microbiota in the development of gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology* 20: 4948-4952.

Wang Q, Dong J, Zhu Y. 2012. Probiotic supplement reduces risk of necrotizing enterocolitis and mortality in preterm very low-birth-weight

infants: an updated meta-analysis of 20 randomized, controlled trials. *Journal of Pediatric Surgery* 47: 241-248.

Westerbeek E, Berg A, Lafeber H, Knol J, Fetter W. P. F, et al. 2006. The intestinal bacterial colonisation in preterm infants: A review of the literature. *Clinical Nutrition* 25: 361-368.

XIV. Apéndices



XIV. 1. ANEXO AL CAPÍTULO VIII: RESULTADOS DE LA PIROSECUENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS

XIV. 1. 1. MATERIAL AND METHODS

DNA extraction

The faecal sample collection included a meconium sample obtained previously to the probiotic administration and, further 20 faecal samples obtained weekly for up to 28 days. All samples were stored immediately after their collection at -80°C .

Samples were defrosted slowly at 4°C to avoid DNA degradation and further tempered at room temperature. An aliquot of 0.5 gr of faeces was solubilized in 5 ml of distilled water and centrifuged at 1,000 rpm and 4°C for 10 minutes to eliminate the fibre. Total DNA from 1 ml of the supernatant was obtained with the commercial kit QIAamp DNA Mini KitPellet (Qiagen, Hilden, Germany).

Gut microbiota composition

After adequate quality and concentration controls, DNA samples were sent to the FISABIO institution (<http://fisabio.san.gva.es>) for massive sequencing of 16S rDNA amplicons in a FLX+System Roche 454 platform. Bioinformatic analysis of the reads was developed also at FISABIO institution; only sequences longer than 50 nucleotides were considered. Bacterial diversity was estimated by the Shannon, the Chao1, and the Abundance-based Coverage Estimator (ACE) indexes and their standard deviations. Taxonomic affiliations have been assigned using the RDP_classifier from the Ribosomal Database Project (Cole et al., 2009), and reads with RDP score value below 0.8 were assigned to the upper taxonomic rank, leaving last rank as unidentified. All statistics were obtained using the RStatistics software (R Core Team, 2012) and several open source libraries.

XIV. 1. 2. RESULTS

Gut microbiota composition

Samples taken at day 14 of infants 3 and 5 were excluded after sequencing due to the low number of sequences obtained (Table 1). The average number of sequences and OTU's per sample were 3500 and 32, respectively. The Shannon diversity index (SDI) of the fecal samples was variable depending on the individual, although there was a global tendency to decrease along the time. In infant 1 the initial microbial diversity was the lowest value recorded and, contrary to other individuals, it increased from day 0 (SDI = 0.39) to day 21 (SDI = 1.39).

Globally, *Proteobacteria* was the dominant phylum (69-89%) in fecal samples before starting the probiotic treatment, except in samples from infant 1 where 93% of the reads corresponded to the phylum *Terrificutes* (93%) (Figure 1). After the first week of intervention, the proportion of *Firmicutes* increased significantly and represented 33-74% of the total reads in the fecal samples, except in those of infant 5 where the proportion of *Proteobacteria* did not change. However, the results suggest an overall tendency towards a reduction in *Firmicutes* and the recovery of the initial percentage of *Proteobacteria* after two weeks of probiotic administration.

A high variability was observed among the participants in the bacterial composition of their feces at the family level. In general, it was observed that *Lactobacillaceae*, *Staphylococcaceae*, and *Enterococcaceae* from phylum *Firmicutes* and *Enterobacteriaceae* and *Moraxellaceae* from phylum *Proteobacteria* were the predominant bacterial families (Figure 1).

At a lower taxonomic level, dominance of reads belonging to the genera *Ureaplasma*, *Acinetobacter* and *Pseudomonas* was registered before the probiotic treatment. After 7 and 14 days of daily intake of the probiotic, the prevailing genera were *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Raoultella*, *Enterococcus* and some unclassified *Enterobacteriaceae*. Only three samples were available at day 21 (2 samples) and 28 (1 sample), and *Escherichia*, *Lactobacillus* and *Enterobacter* were the predominant genera in these fecal samples.

XIV. 1. 3. REFERENCES

Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ. et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37.

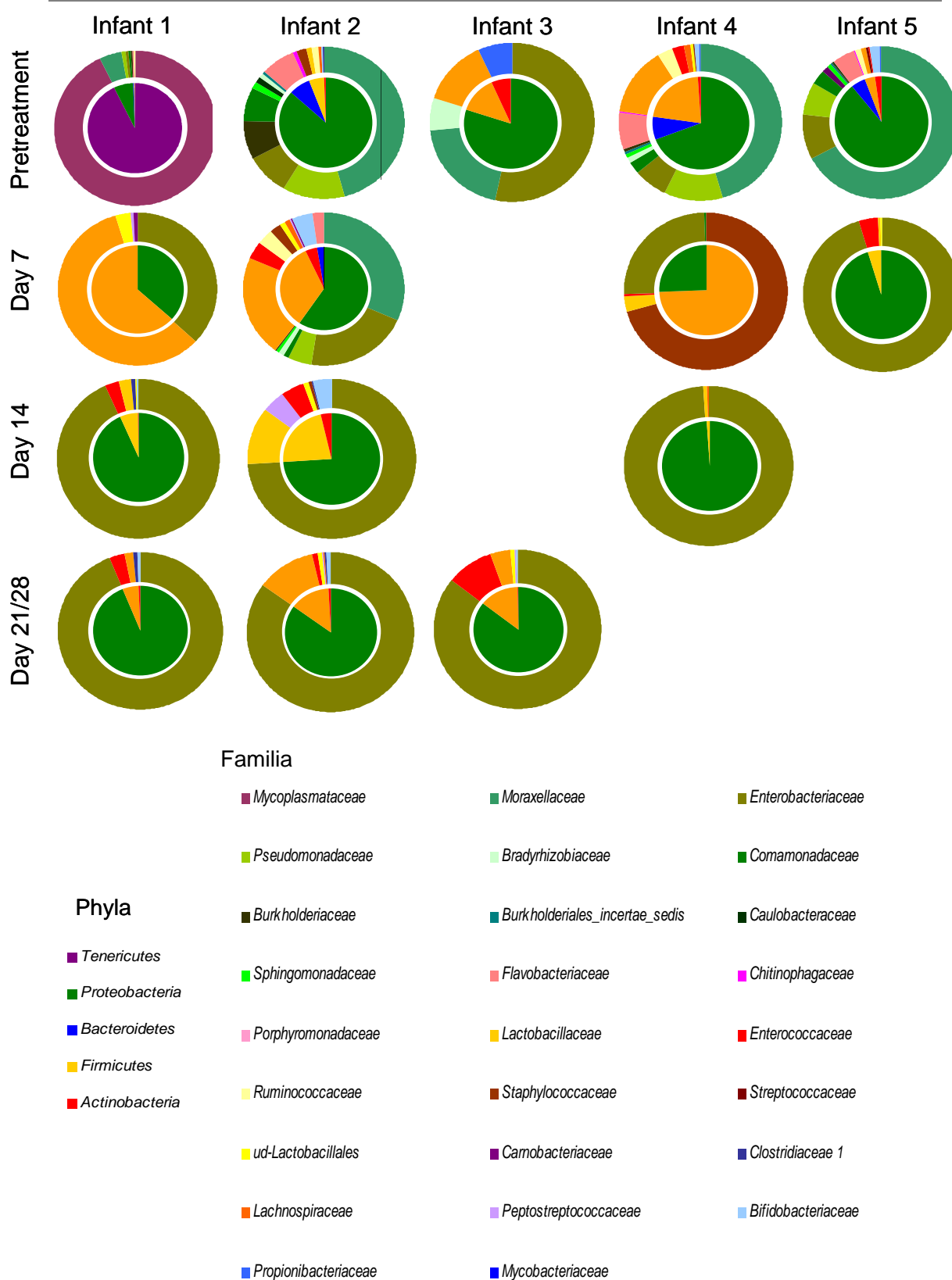


Figure 1. Aggregate microbiota composition at pylum/family level from fecal samples

Table 1. Summary of global data obtained after the next generation sequencing process.

Infant	Day	No. of total sequences	No. of OTU's	Shannon index
1	0	9035	35	0.39
	7	134	8	1.19
	14	1436	14	1.40
	21	1252	9	1.39
2	0	1203	54	2.34
	7	9095	94	2.36
	14	3008	19	1.75
	21	3395	20	0.64
3	0	15	8	1.99
	28	5245	16	1.18
4	0	1931	51	2.18
	7	7211	20	0.85
	14	5977	14	1.17
5	0	5330	72	1.63
	7	2162	12	1.32

OTU: del ingles *Operational Taxonomis unit*

XIV. 2. Bacteriological and immunological profile of preterm infant gut: a two-years follow-up study

XIV. 2. 1. ABSTRACT

The abnormal colonization pattern of the preterm gut may affect immune maturation and exert a long-term influence on the gut bacterial composition and host health. However, follow-up studies assessing the evolution of the fecal microbiota of infants that were born preterm are very scarce. In this work, the bacterial diversity of fecal samples obtained from sixteen 2-year-old infants was evaluated using a phylogenetic microarray; subsequently, the results were compared with those obtained in a previous study from samples of meconium and feces collected from the same infants while they stayed in the neonatal intensive care unit (NICU). Parallel, the concentration of a wide range of cytokines, chemokines, growth factors and immunoglobulins was determined in all the meconium and fecal samples. Globally, a higher bacterial diversity and a lower interindividual variability was observed in 2-year-old feces when compared to the samples obtained during their first days of life. Hospital-associated fecal bacteria that were dominant during the NICU's stay seemed to be replaced, two years later, by genera which use to be predominant in the healthy adult microbiome. The immune profile of the meconium and fecal samples differed depending on the sampling time, suggesting that it may be related to the gut bacterial composition.

XIV. 2. 2. INTRODUCTION

The microbial composition of the gastrointestinal tract in humans undergoes remarkable changes in our life span (Harmsen et al., 2000; Woodmansey, 2007; O'Toole and Claesson, 2010). The most dynamic period of changes in human intestinal microbiota is reported after birth when the scarce bacteria from the intrauterine life make space for a complex microbial community. Traditionally, the development of gut microbiota in term infants involves early colonization by facultative anaerobes that generate a reducing environment, favoring the growth of strictly anaerobic bacteria (Mackie et al., 1999; Fanaro et al., 2003). From an initial low diversity and low complexity, the intestinal bacterial community of the infant will gradually develop and mature, reaching an enduring adult state at around 2-3 years of age (Koenig et al., 2011; Matamoros et al., 2013).

However, the establishment and development of the gut microbiota differs between preterm and healthy term infants (Madan et al., 2012). In the former, several factors, including mother/infant antibiotherapy, Caesarean section, early separation from the parents, delayed enteral feeding, invasive medical procedures or a long stay in the NICU, exert a strong influence on early colonization of the infant gut (Fanaro et al., 2003; Penders et al., 2006; Murgas Torrazza & Neu, 2011). The abnormal gut colonization in preterm infants during their first weeks of life (Magne et al., 2006; Mshvildadze et al., 2010; LaTuga et al., 2011) may affect the maturation of the gut barrier as well as its nutritional and immunological functions (Sharma et al., 2010; Di Mauro et al., 2013).

There is circumstantial evidence that initial microbial gut colonization and the resulting immune and metabolic programming could have a long-lasting influence on the risk for future diseases (Matamoros et al., 2013). However, little is known about the possible influence of gut microbiota on the human immune system and how early bacterial colonization affects the immune maturation (Johansson et al., 2012), particularly among preterm infants (Jacquot et al., 2011). Several studies have assessed immune compounds in saliva, umbilical cord blood or peripheral blood of infants (Blanco-Quiros et al., 2000; Wan et al., 2003; Matoba et al., 2009; Sjogren et al., 2009; Johansson et al., 2012; Lusyati et al., 2013) but few have described the presence of cytokines, chemokines, growth factors or immunoglobulins in fecal samples of preterm babies (Mohan et al., 2008; Richter et al., 2010; Westerbeek et al., 2011).

In this context, the objectives of this study were, firstly, to study if the abnormal initial colonization of preterm babies previously studied (Moles et al., 2013) may affect their fecal bacterial composition when they are 2-year-old by using a phylogenetic microarray (Rajilic-Stojanovic et al., 2009) and, secondly, to characterize and compare the immune profile of the meconium and infants feces obtained from such infants in the first weeks after birth and, also, at the age of 2.

XIV. 2. 3. METHODS

XIV. 2. 3. 1. Patients and sampling

This prospective study included sixteen 2-year-old infants that were born prematurely at the Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid (Spain) (Table 1). Written informed parental consent was obtained for each infant before inclusion in the study, which was approved by the Ethical Committee on Clinical Research of the Hospital Clínico San Carlos of Madrid (10/017-E). Characteristics to be eligible for enrolment have been described previously (Moles et al., 2013). Relevant clinical data recorded for each infant, such as length of antibiotherapy, parenteral nutrition, nasogastric feeding, mechanical ventilation, hospital stay and type of feeding, are described in Table 2. All infants were fed with human milk (donor milk and/or their own mother's milk) and, occasionally, with preterm formula.

The medical staff of the Department of Neonatology of the hospital had collected first spontaneously evacuated meconium and fecal samples during their stay at the NICU (Moles et al., 2013). Later, when the infants reached 2 years of age, parents were contacted by phone to provide an additional fecal sample if their infants had not taken antibiotics within the previous 2 months. All the samples were stored at -20 °C until analysis and processed as described previously (Moles et al., 2013).

XIV. 2. 3. 2. Human Intestinal Tract Chip (HITChip) analysis

DNA extraction from fecal samples was performed following the protocol described in Moles et al. (2013). All the steps for the HITChip microarray analysis, including PCR amplification of 16S rRNA genes, RNA production and labeling, hybridization and data extraction, were performed basically as described by Rajilic-Stojanovic et al. (2009). Then, the PCR products were purified by using the High Pure PCR Product Purification kit (Roche, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. In vitro transcription of the T7 promoter-carrying 16S rRNA genes was performed using the Riboprobe System (Promega, Madison, WI, USA) while amino-allyl-modified nucleotides were coupled with CyDye using the Post-Labeling Reactive Dye (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK).

Data were extracted from the microarray images using the Agilent Feature Extraction software, version 9.1 (<http://www.agilent.com>), subsequently normalized, and further analyzed using a set of R-based scripts (<http://r-project.org>) in combination with a custom-designed relational database that runs under the MySQL database management system (<http://www.mysql.com>; Nubel et al., 1997). Hierarchical clustering of probe profiles was carried out using the Pearson distance and Ward's minimum variance method.

XIV. 2. 3. 3. Immunological analysis

The concentrations of 18 cytokines, chemokines, and growth factors, including interleukins (IL) 1 β , 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12(p70), 13, and 17, interferon-gamma (IFN- γ), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), growth regulated oncogene-alpha (Gro- α), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1 β (MIP-1 β) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), were determined in meconium and fecal samples by using the Human Cytokine group I and II assay kits (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) in a Bioplex 200 system instrument (Bio-Rad). Briefly, 0.1 g of fecal samples was suspended in 1 mL of PBS. After homogenization, the samples were centrifuged (14,000 \times g, 15 min, 4 $^{\circ}$ C) and the supernatants (\geq 200 μ L) were collected. Determinations in meconium and fecal samples were carried out in duplicate.

The concentrations of immunoglobulin (Ig) G1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM and IgA in the samples were determined using the Bio-Plex Pro Human Isotyping Assay kit (Bio-Rad) using the Bioplex 200 system. For this purpose, the samples were conditioned as described above for cytokine analysis. All analyses were carried out in duplicate following the manufacturer's protocol.

Calibration curves for each analyte were constructed using triplicate values for each known concentration and the Bio-Plex Manager 6.0 software (Bio-Rad).

XIV. 2. 3. 4. Statistical analysis

Quantitative data were expressed as the mean and 95% confidence interval (CI) of the mean or, when they were not normally distributed, as the median and interquartile range (IQR). The richness and diversity of the meconium and fecal microbiota were determined by calculating the Shannon-Weaver diversity index, which takes into account the number and evenness of the bacterial species. Friedman's non-parametric repeated measures comparisons and paired sample t-tests were applied to determine differences between the hybridization signal intensities of genus-like bacterial groups across time. Chi-square independency tests were used to evaluate differences in the detection frequencies of immune compounds. One-way ANOVA or Kruskal-Wallis tests were used to compare differences in the concentration of immune compounds at different sampling times. The immune compounds were further analyzed applying exploratory multivariate analyses, such as principal component analysis (PCA), multiple discriminant analysis (MDA) and cluster analysis (CA). Differences were considered significant at $P < 0.05$. Statgraphics Centurion XVI version 16.1.15 (Statpoint Technologies Inc., Virginia, USA) and R 2.13.2 (R project, Statistical Software) software were used to carry out the analyses cited above.

For comprehensive multivariate statistical analyses, Canoco software for Windows 5.0 (Wageningen, The Netherlands) was used. Redundancy analysis was performed to assess correlations between the microbial groups detected by the HITchip and the sample characteristics. The log-transformed hybridization signals of 131 genus-

level phylogenetic groups targeted by the HITChip were used as biological variables. Gestational age, gender, birth weight, Z score, vaginal vs cesarean section, age, antibiotics (mother and/or infant), time of first passage of meconium, type of nutrition, time of enteral and parenteral nutrition, sepsis and hospital stay were included as explanatory variables. The Monte Carlo Permutation Procedure was used to assess significance of the variation in large data sets.

XIV. 2. 4. RESULTS

XIV. 2. 4. 1. Characteristics of the infants

The 16 infants that participated in this study had, at birth, a mean gestational age of 28 weeks (ranging from 24 to 32 weeks) and a mean birth weight of 1,220 g (ranging from 600 to 2,030 g) (Table 1). Half of the infants (n=8) were born by Cesarean section. All of them, except one, received antibacterial prophylaxis at least for the first 3 days of life, and nine needed mechanical ventilation (Table 2). Infants were fed either with their own mother's milk, donor milk and/or preterm formula by nasogastric feeding tube for, at least, 18 days after delivery. The time required for spontaneous delivery of the first meconium oscillated between the first minutes to day 5 after birth.

XIV. 2. 4. 2. HITChip analysis

The microarray datasets of the 16 fecal samples collected two years after birth (~730 d) and those previously obtained from meconium and feces collected in the third week of life (~21 d) (Moles et al., 2013) were acquired and hierarchically clustered in a heat map based on the signal intensity of the 3,699 distinct HITChip oligonucleotide probes (Figure 1). The meconium samples (with the exception of those corresponding to infants 4, 6 and 22), the third week's fecal samples and the 2-year's ones clustered in three different groups according to the sampling times (Figure 1).

The relative contribution of the major phyla was assessed as the percentage of the phylum/order taxa among the total microbiome detected in each fecal sample (Figure 2). Globally, approximately two thirds of the DNA sequences retrieved from the meconium samples were ascribed to the Firmicutes phylum (63.4%). The phylum Proteobacteria dominated in the 21 days fecal samples (about 60.0%) but became a minor one in the 2-years samples (2.5%). Interestingly, Firmicutes was again the most abundant phylum (78.5%) in the later samples, followed by Actinobacteria (9.9%) and Bacteroidetes (7.7%).

In relation to Firmicutes, those belonging to the class Bacilli were the most abundant both in meconium and 21 d feces (18.8%). However, the diversity of Firmicutes was notably higher in 2-years fecal samples where *Clostridium* cluster XIVa (35.2%) and *Clostridium* cluster IV (27.1%) became the predominant classes (Figure 3).

On a lower taxonomic level, the comparison of the 131 hybridization signals, corresponding to the genus-like bacterial groups (level 2), obtained from the 21 d and 730 d fecal samples showed that 91 phylogenetic groups differed significantly between both types of samples. Among them, 60 phylogenetic groups contributed for, at least, more than 0.1% to the microbial profile of each sample (Table 3). The presence of 10 genus-like groups was significantly decreased in the 2-years fecal samples compared to the 21 d ones. It should be highlighted that most of the genera that were significantly reduced are typically associated to hospital environments, including *Enterobacter*

aerogenes et rel., Enterococcus et rel., E. coli et rel., Granulicatella et rel., K. pneumoniae et rel., Proteus et rel., Serratia and Yersinia et rel. In contrast, there was a very high increase ($\square 40$ times) in the abundance of Anaerostipes caccae et rel., Bacteroides vulgatus et rel., Coprococcus eutactus et rel., Eubacterium hallii et rel., Lactococcus, Ruminococcus bromii et rel., and Ruminococcus obeum et rel. from 21 d to 2-years feces (Table 3).

The Shannon-Weaver diversity indices obtained from meconium, 21 d and 2 years fecal samples were compared with data available on the HITChip database of fecal samples from 2-4-year-old healthy infants and, also, from healthy adults (Figure 4). The microbial diversity increases with age both in preterm and healthy individuals. Diversity indices differed significantly among all the groups, except for (a) the meconium and 21 d samples, and (b) the 2-years samples obtained in this study and the data from 2-4-year-old healthy infants existing in the HITChip database (paired t-test; $P = 0.511$ and $P = 0.957$, respectively).

The relationships between the observed differences in the bacterial profiles detected in meconium, 21 d and 2-years feces and several demographic and clinical variables (Tables 1 and 2) were explored with multivariate cluster analysis. Redundancy analysis revealed that, among all variables explored, only the age of the infant had a significant effect on the bacterial community composition at the different sampling times ($P = 0.006$, Monte Carlo Permutation Procedure) (Figure 5). More specifically, the observed distribution could explain 41.4% of the variation in the abundance of 30 bacterial groups (Figure 5). Bacterial groups that were positively associated with increased age included bacteria belonging to the butyrate-producing species such as Butyrivibrio crossotus, Eubacterium rectale, Eubacterium hallii and Ruminococcus obeum. In contrast, the groups that were negatively associated with age included potentially pathogenic Gram-negative bacteria typically related to hospital environments, such as Escherichia, Klebsiella, Serratia and Yersinia. The uniform length of all vectors depicted in Figure 5 indicates that the strength of the correlation was similar for all bacterial species. The length of the hospital stay was also found to be associated (although not significantly) with 21 d fecal samples and with specific bacterial groups (most notably the Proteobacteria phylum). None of the rest of variables significantly influenced the sample separation (data not shown). (paired t-test; $P = 0.511$ and $P = 0.957$, respectively).

XIV. 2. 4. 3. Immunological analysis

The concentration of a broad range of immune compounds including cytokines, chemokines, growth factors and immunoglobulins was measured in 9 meconium and 9, 15 and 16 fecal samples from the first week, third week and second year of life, respectively. Initially, an exploratory screening was performed in order to detect outliers; this analysis revealed that the 2-years fecal sample from infant 2 was very different from the rest of the sample set in the PCA analysis of immune compounds (data not shown). The medical history from this infant reflected a high incidence of

acute otitis media during the first two years of life and, in fact, few days after the collection of this fecal sample, this infant was submitted to an emergency surgery. Therefore, this sample was excluded from the general immunological analysis.

Globally, the values obtained for all these immune factors showed a high interindividual variability in both detection frequencies and concentration. Meconium samples showed lower presence of immunocompounds compared to fecal samples, except for MIP-1 β and GM-CSF (Table 4). Most cytokines related to either innate and acquired immunity were detected in less than 50% of the samples except for IL-1 β in the first and third weeks of life, IL-4 (which detection frequency increased over time), and IL-17 in the third week and after two years from birth. Among the chemokines, MCP-1 (2-years samples) and MIP-1 β (meconium, first and third weeks fecal samples) were also detected in more than 50% of the samples while the hematopoietic factors G-CSF and GM-CSF were detected in a higher number of them (Table 4). All the detection frequencies (except those for IL-6 and IL-13) changed significantly ($P < 0.018$) depending on the sampling time (Table 4). However, only GM-CSF showed a statistically significant difference ($P = 0.002$), with higher levels in meconium and 2-years samples, when the evolution over time of the concentrations of all the immunocompounds was considered (Table 4). Some immunocompounds (IL-1 β , IL-2 and MIP-1 β) showed a decreasing tendency while others (IL-6, IL-12(p70), IFN- γ , TNF- α , MCP-1 and IL-5) tended to increase over time.

The concentrations of IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM and IgA in meconium and fecal samples taken at 7, 21 and 730 days after birth are shown in Table 5. With the exception of IgA, a high degree of variability and a low frequency of detection were observed for immunoglobulins. Similarly to cytokines, the detection frequencies of all the immunoglobulins changed significantly depending on the sampling time but no statistically-significant differences were found in relation to their concentrations. IgA was the most abundant immunoglobulin in all the tested samples with a significant change ($P = 0.004$) over time. The IgA's concentrations in the first week fecal samples (26.62 mg/g) were approximately 26 times higher than that detected in the meconium ones (1.02 mg/g).

When multiple discriminant analysis (MDA) was applied to all the variables, taking infant's age as the discriminant factor, two derivative functions with an eigenvalue > 1 were obtained. The predictive power of the MDA was 85.42% and the expression of the first derivative function (Function 1) had a canonical correlation factor of 0.9018 that was statistically significant ($P = 0.002$). The standardized coefficients for this function were the following: IL-1b (-0.96), IL-2 (-3.38), IL-4 (1.22), IL-5 (-0.56), IL-6 (-0.48), IL-7 (-1.72), IL-8 (-2.81), IL-10 (-4.56), IL-12(p70) (4.50), IL-13 (-1.10), IL-17 (-5.61), G-CSF (4.38), GM-CSF (-0.67), IFN- γ (4.49), MCP-1 (0.81), MIP-1 β (8.88), TNF- α (1.60), GRO- α (-4.78), IgG1 (2.13), IgG2 (6.37), IgG3 (-2.71), IgG4 (-0.50), IgM (0.36), IgA (0.30). In fact, the MDA representation allowed a differential classification of fecal samples according to the infant's age when considering their profile of immune compounds (Figure 6). Furthermore, the centroid of each group of

samples (meconium, first week, third week and 2-years feces) was located in a different quadrant of the coordinates delimited by the zero values of the axes (Figure 6).

XIV. 2. 5. DISCUSSION

In this study, the bacterial composition of fecal samples obtained from 2-year-old infants that were born preterm was assessed and compared to that of meconium and third week of life fecal samples obtained from the same infants (Moles et al., 2013). In addition, a wide range of cytokines, chemokines, growth factors and immunoglobulins were determined in all the meconium and fecal samples in order to describe their immunological profiles, their changes over time and their potential relationships with bacterial colonization.

The results obtained from meconium and third week fecal samples showed a low diversity of bacterial species and high interindividual variability while the opposite was observed in those taken from the same infants at the age of 2. Globally, the bacterial communities evolved towards an adult-like microbiota, which is the normal evolution of the microbiome of healthy term infants as they age (Palmer et al., 2007). Fecal samples taken 2 years after birth showed a distinctive bacterial composition when compared to that obtained from the same infants when they were 3-week-old. Those genera related with hospital environment, such as *E. coli*, *Klebsiella* or *Serratia*, present in the third week of life seemed to be replaced two years later by genera belonging to *Clostridium* clusters IV and XIVa. The predominance of such genera is a feature of the healthy adult gut microbiome, as a part of a complex microbiota which is characterized by slow turnover, preference for low redox potential and high production of short chain fatty acids (Hao & Lee, 2004).

In this study, bacterial diversity increased with age in agreement with previous works that have reported that the number of OTUs detected in fecal samples increases with age in different human populations (Yatsunenکو et al., 2012). The Shannon diversity index of the microbiota present in 2-year-old infants stools was higher to that observed in the 21 d ones, similar to that calculated from the 2-4-year-old healthy infants' HITChip database, and lower to that of healthy adults as deduced using the same database. Remarkable changes occur in the gut colonization pattern throughout the two or three first years of life but, then, the microbiota stabilizes and starts to resemble that of adulthood (Wilks, 2007; Koenig et al., 2011). The results of this study indicates that diversity of the gut microbiota of 2-year-old infants that were born preterm has not reached the attributes of the adult microbiome, yet.

Colonization of the infant gut by lactobacilli and bifidobacteria is often delayed or even absent in the case of antibiotic-treated infants (Gewolb et al., 1999; Bennet et al., 2002; Penders et al., 2006), including preterm neonates (Moles et al., 2013). The results obtained in this study indicate that this may be a long lasting effect of prematurity since, after two years from birth, the relative abundance of lactobacilli and bifidobacteria was still low.

Previous studies focused on the detection and quantification of cytokines, chemokines and immunoglobulins in blood samples from term and preterm infants have shown that there are differences in their immune profiles depending on their gestational

age (Blanco-Quiros et al., 2000; Matoba et al., 2009; Lusyati et al., 2013). However, as far as we know, this is the first study where a wide range of immune compounds has been assessed in meconium and feces of preterm infants and followed up when they were 2-year-old. Interestingly, each type of sample (meconium, 7 d, 21 d and 2-years feces) showed a different immune pattern and, in fact, the MDA analysis performed with all the immune variables exhibited a high predictive power highlighting the differences in the immune profiles among the different sampling times.

In this study, the IgA concentration increased notably from meconium to first week feces. This probably results from the massive arrival of bacteria and other antigens to the gut after birth since microbial gut colonization triggers the production of IgA by the gut-associated lymphoid tissue (GALT) (Suzuki et al., 2007). In addition, lactating mammary glands are part of the secretory immune system, and IgA antibodies in breast milk reflect antigenic stimulation of mucosal-associated lymphoid tissue (Brandtzaeg, 2010). Breast-milk antibodies are, thus, highly targeted against infectious agents and other exogenous antigens in the mother's environment, which are those likely to be encountered by the infant (Mohan et al., 2008). Therefore breastfeeding represents an ingenious immunologic mother-infant integration (Brandtzaeg, 2010; Garofalo, 2010; Tomicic et al., 2010; Castellote et al., 2011). This fact highlights the importance of the availability of own mother's or donor's milk to feed preterm neonates, a population particularly sensitive to infectious and inflammatory diseases. It should be noted that an abnormal gut microbial colonization predisposes the neonatal intestine to inflammation and to a cascade of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines responses (Mai et al., 2013). The ability of IgA to penetrate the gut mucosal surface in conjunction with antigens and, as a consequence, to induce effector immune responses, plays a key role in the maintenance of intestinal microbiota and immune homeostasis (Rogosch et al., 2012).

Work is in progress to characterize the wide collection of bacterial isolates obtained from the biological samples analyzed in this study and, therefore, to elucidate at the strain or clone level if initial colonizers may persist later in life.

XIV. 2. 6. REFERENCES

- Bennet, R., Eriksson, M., & Nord, C. (2002) The fecal microflora of 1–3-month-old infants during treatment with eight oral antibiotics. *Infection* 30: 158-160.
- Blanco-Quiros, A., Arranz, E., Solis, G., Villar, A., Ramos, A., & Coto, D. (2000) Cord blood interleukin-10 levels are increased in preterm newborns. *Eur J Pediatr* 159: 420-423.
- Brandtzaeg, P. (2010) The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *J Pediatr* 156 Suppl 2: 8-15.
- Castellote, C., Casillas, R., Ramirez-Santana, C., Perez-Cano, F. J., Castell, M., Moretones, M. G. et al. (2011) Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *J Nutr* 141: 1181-1187.
- Di Mauro, A., Neu, J., Riezzo, G., Raimondi, F., Martinelli, D., Francavilla, R., & Indrio, F. (2013) Gastrointestinal function development and microbiota. *Ital J Pediatr* 39: 1-7.
- Espinosa-Martos, I., Moles, L., Manzano, S., Fernández, L., Montilla, A., Corzo, N., & Ares, S. and Rodríguez, J.M. (2014) Bacteriological, biochemical and immunological properties of colostrum and milk from mothers of extremely preterm infants. *JPGN* in press
- Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P., & Vigi, V. (2003) Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl* 91: 48-55.
- Garofalo, R. (2010) Cytokines in human milk. *J Pediatr* 156: S36-40.
- Gewolb, I. H., Schwalbe, R. S., Taciak, V. L., Harrison, T. S., & Panigrahi, P. (1999) Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* Ed 80: F167-73.
- Hao, W., & Lee, Y. (2004) Microflora of the gastrointestinal tract. In *Public Health Microbiology*. Springer, pp. 491-502.
- Harmsen, H. J., Wildeboer-Veloo, A. C., Raangs, G. C., Wagendorp, A. A., Klijn, N., Bindels, J. G., & Welling, G. W. (2000) Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 30: 61-67.
- Jacquot, A., Neveu, D., Aujoulat, F., Mercier, G., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., & Picaud, J. C. (2011) Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *J Pediatr* 158: 390-396.
- Johansson, M. A., Saghafian-Hedengren, S., Haileselassie, Y., Roos, S., Troye-Blomberg, M., Nilsson, C., & Sverremark-Ekstrom, E. (2012) Early-life gut bacteria

associate with IL-4-, IL-10- and IFN-gamma production at two years of age. PLoS One 7: e49315.

Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R. et al. (2011) Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. Proc Natl Acad Sci U S A 108 Suppl 1: 4578-4585.

LaTuga, M. S., Ellis, J. C., Cotton, C. M., Goldberg, R. N., Wynn, J. L., Jackson, R. B., & Seed, P. C. (2011) Beyond bacteria: a study of the enteric microbial consortium in extremely low birth weight infants. PLoS One 6: e27858.

Lusyati, S., Hulzebos, C. V., Zandvoort, J., Sukandar, H., & Sauer, P. J. (2013) Cytokines patterns in newborn infants with late onset sepsis. J Neonatal Perinatal Med 6: 153-163.

Mackie, R. I., Sghir, A., & Gaskins, H. R. (1999) Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. Am J Clin Nutr 69: 1035S-1045S.

Madan, J. C., Salari, R. C., Saxena, D., Davidson, L., O'Toole, G. A., Moore, J. H. et al. (2012) Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 97: F456-F462.

Magne, F., Abely, M., Boyer, F., Morville, P., Pochart, P., & Suau, A. (2006) Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by sequences of 16S rRNA genes and PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles. FEMS Microbiol Ecol 57: 128-138.

Mai, V., Torrazza, R. M., Ukhanova, M., Wang, X., Sun, Y., Li, N. et al. (2013) Distortions in development of intestinal microbiota associated with late onset sepsis in preterm infants. PloS One 8: e52876.

Matamoros, S., Gras-Leguen, C., Le Vacon, F., Potel, G., & de La Cochetiere, M. F. (2013) Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. Trends Microbiol 21: 167-173.

Matoba, N., Yu, Y., Mestan, K., Pearson, C., Ortiz, K., Porta, N. et al. (2009) Differential patterns of 27 cord blood immune biomarkers across gestational age. Pediatrics 123: 1320-1328.

Mohan, R., Koebnick, C., Schildt, J., Mueller, M., Radke, M., & Blaut, M. (2008) Effects of Bifidobacterium lactis Bb12 supplementation on body weight, fecal pH, acetate, lactate, calprotectin, and IgA in preterm infants. Pediatr Res 64: 418-422.

Moles, L., Gomez, M., Heilig, H., Bustos, G., Fuentes, S., de Vos, W. et al. (2013) Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. PLoS One 8: e66986.

Mshvildadze, M., Neu, J., Shuster, J., Theriaque, D., Li, N., & Mai, V. (2010) Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques. *J Pediatr* 156: 20-25.

Murgas Torrazza, R., & Neu, J. (2011) The developing intestinal microbiome and its relationship to health and disease in the neonate. *J Perinatol* 31 Suppl 1: S29-34.

Nubel, U., Garcia-Pichel, F., & Muyzer, G. (1997) PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* 63: 3327-3332.

O'Toole, P. W., & Claesson, M. J. (2010) Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly. *Int Dairy J* 20: 281-291.

Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., & Brown, P. O. (2007) Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 5: e177.

Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I. et al. (2006) Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118: 511-521.

Rajilic-Stojanovic, M., Heilig, H. G., Molenaar, D., Kajander, K., Surakka, A., Smidt, H., & de Vos, W. M. (2009) Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environ Microbiol* 11: 1736-1751.

Richter, M., Topf, H. G., Groschl, M., Frohlich, T., Tzschoppe, A., Wenzl, T. G., & Kohler, H. (2010) Influence of gestational age, cesarean section, and type of feeding on fecal human beta-defensin 2 and tumor necrosis factor-alpha. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 51: 103-105.

Rogosch, T., Kerzel, S., Hoss, K., Hoersch, G., Zemlin, C., Heckmann, M. et al. (2012) IgA response in preterm neonates shows little evidence of antigen-driven selection. *J Immunol* 189: 5449-5456.

Sharma, R., Young, C., & Neu, J. (2010) Molecular modulation of intestinal epithelial barrier: contribution of microbiota. *J Biomed Biotechnol* 2010: 305879.

Sjogren, Y. M., Tomicic, S., Lundberg, A., Bottcher, M. F., Bjorksten, B., Sverremark-Ekstrom, E., & Jenmalm, M. C. (2009) Influence of early gut microbiota on the maturation of childhood mucosal and systemic immune responses. *Clin Exp Allergy* 39: 1842-1851.

Suzuki, K., Ha, S. A., Tsuji, M., & Fagarasan, S. (2007) Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. *Semin Immunol* 19: 127-135.

Tomicic, S., Johansson, G., Voor, T., Bjorksten, B., Bottcher, M. F., & Jenmalm, M. C. (2010) Breast milk cytokine and IgA composition differ in Estonian and Swedish mothers-relationship to microbial pressure and infant allergy. *Pediatr Res* 68: 330-334.

Wan, A. K., Seow, W. K., Purdie, D. M., Bird, P. S., Walsh, L. J., & Tudehope, D. I. (2003) Immunoglobulins in saliva of preterm and full-term infants. *Oral Microbiol Immunol* 18: 72-78.

Westerbeek, E. A., Morch, E., Lafeber, H. N., Fetter, W. P., Twisk, J. W., & Van Elburg, R. M. (2011) Effect of neutral and acidic oligosaccharides on fecal IL-8 and fecal calprotectin in preterm infants. *Pediatr Res* 69: 255-258.

Wilks, M. (2007) Bacteria and early human development. *Early Hum Dev* 83: 165-170.

Woodmansey, E. J. (2007) Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol* 102: 1178-1186.

Yatsunenko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M. et al. (2012) Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486: 222-227.

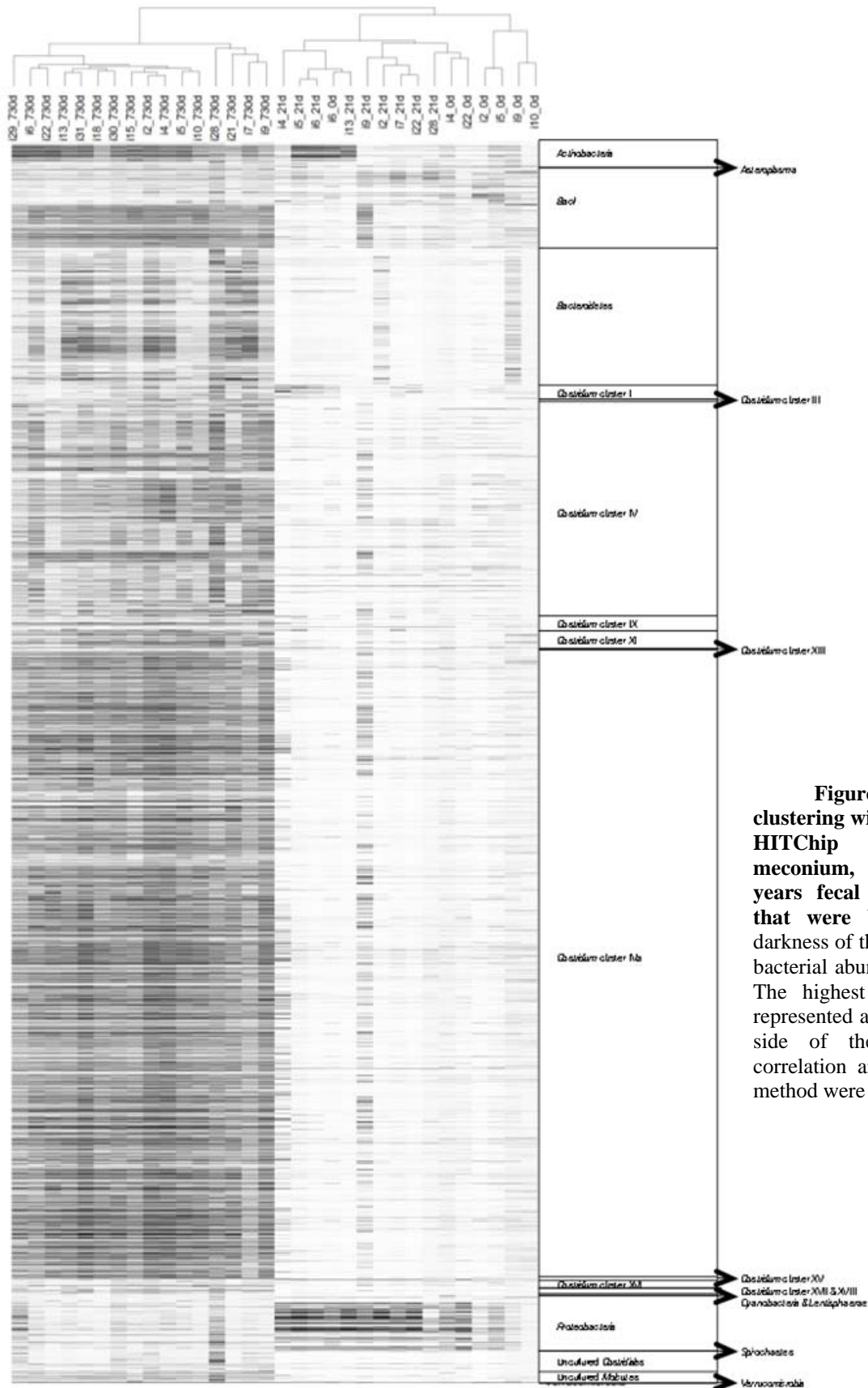


Figure 1. Hierarchical clustering with a heat map of the HITChip profiles from meconium, third week and 2-years fecal samples of infants that were born preterm. The darkness of the lines represents the bacterial abundance in the sample. The highest phylogenetic levels represented are shown on the right side of the figure. Pearson's correlation and Ward's clustering method were used.

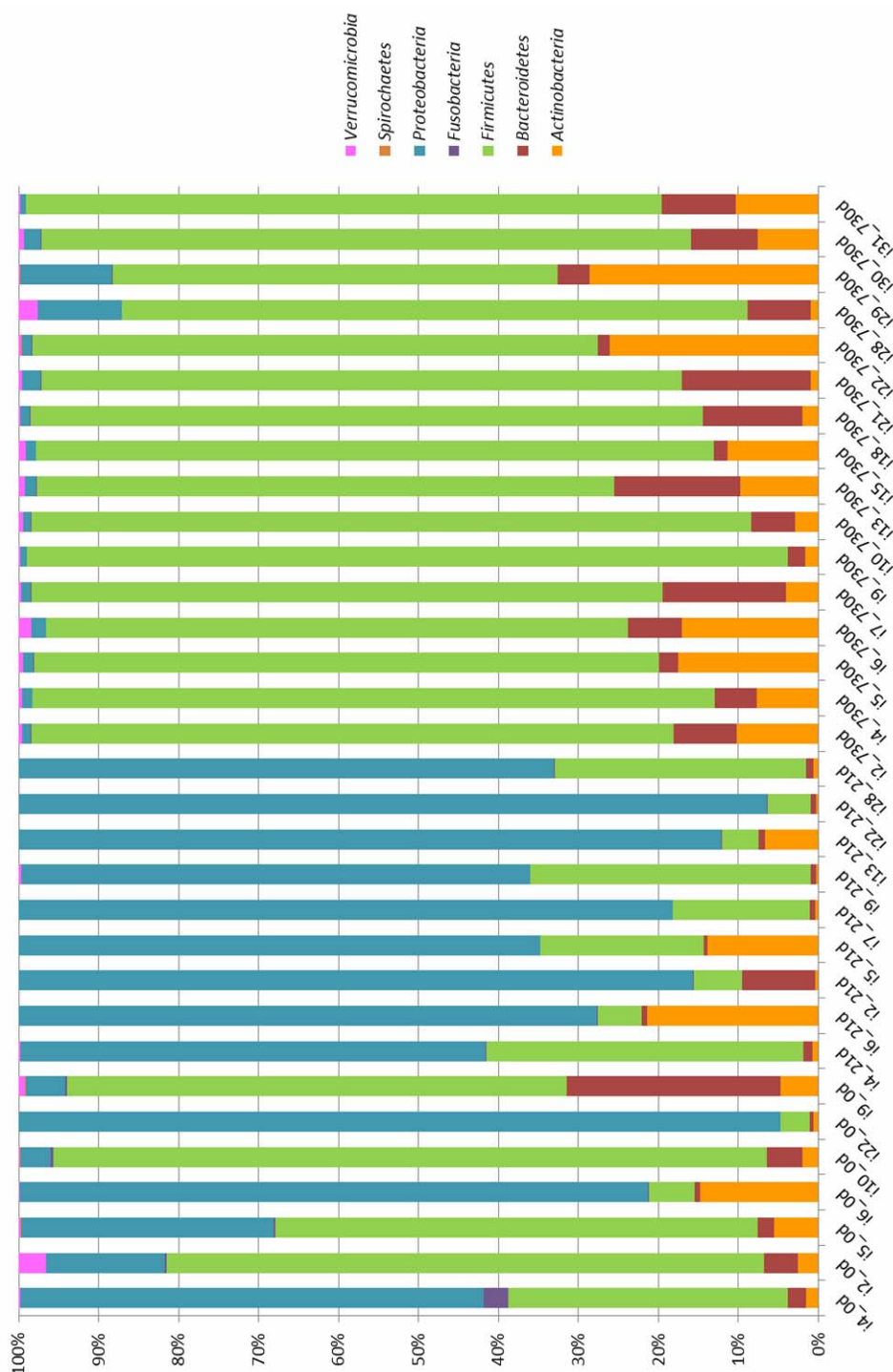


Figure 2. Relative contribution of the phyla detected in meconium (0d), third week (21d) and 2-years (730d) fecal samples of infants that were born preterm, as assessed using the HITChip microarray.

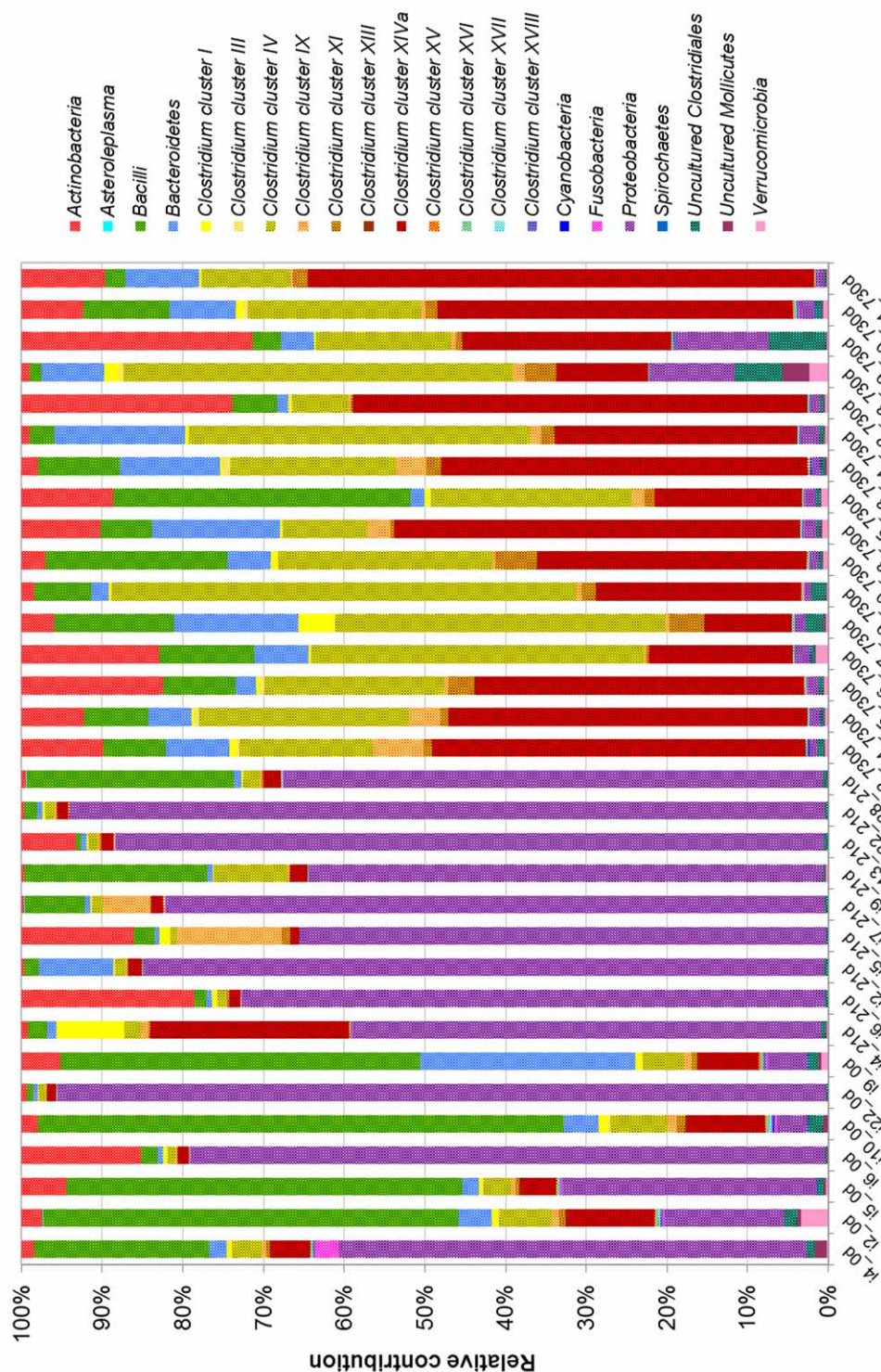


Figure 3. Relative contribution of the phylum/order-like phylogroups to the microbiota of meconium (0d), third week (21d) and 2-years (730d) fecal samples of infants that were born preterm, as assessed using the HITChip microarray. Only phylum/order-like phylogroups that contributed for at least 0.1% to a given profile are shown.

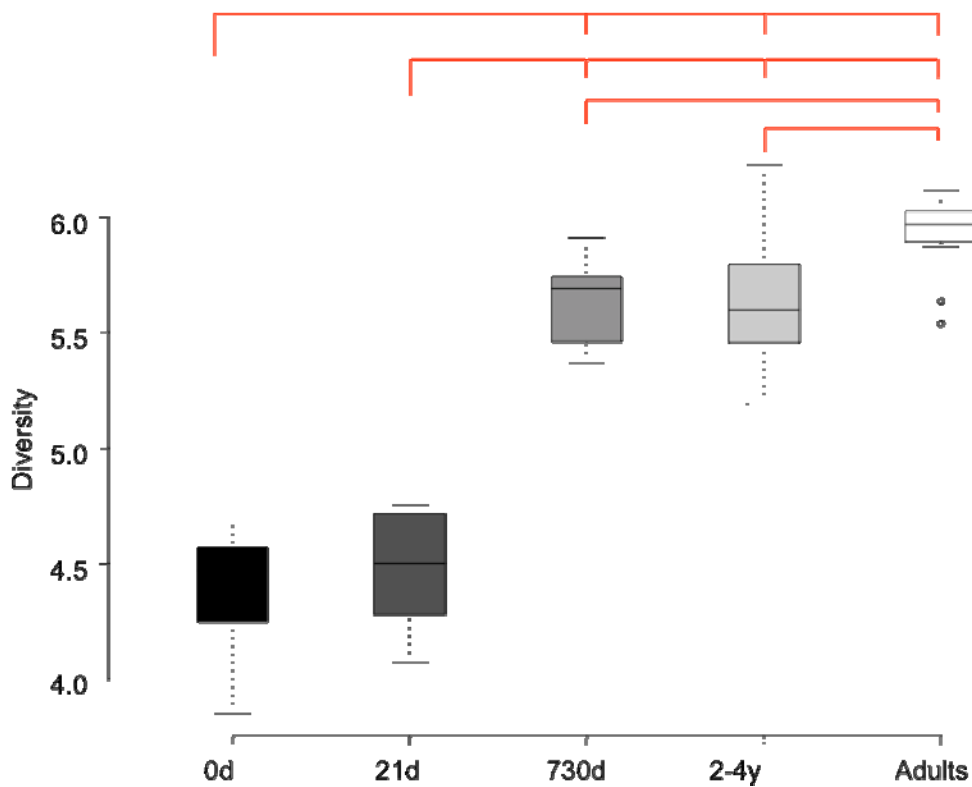


Figure 4. Shannon-Weaver diversity indices of meconium, third week and 2-years fecal samples of infants that were born preterm, as assessed using the HITChip microarray. Boxes at the right and middle represent Shannon-Weaver diversity index obtained in meconium (0d), 21 d and 2 years feces. Boxes on the right represent Shannon-Weaver diversity indices previously obtained with the HITChip in feces from 2 to 4-years-old healthy infants and from healthy adults. The bars on top represent pairs of indices that were found to be statistically different ($P < 0.001$).

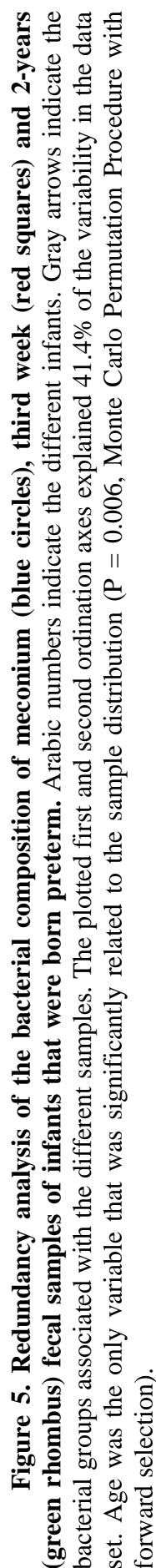


Figure 5. Redundancy analysis of the bacterial composition of meconium (blue circles), third week (red squares) and 2-years (green rhombus) fecal samples of infants that were born preterm. Arabic numbers indicate the different infants. Gray arrows indicate the bacterial groups associated with the different samples. The plotted first and second ordination axes explained 41.4% of the variability in the data set. Age was the only variable that was significantly related to the sample distribution ($P = 0.006$, Monte Carlo Permutation Procedure with forward selection).

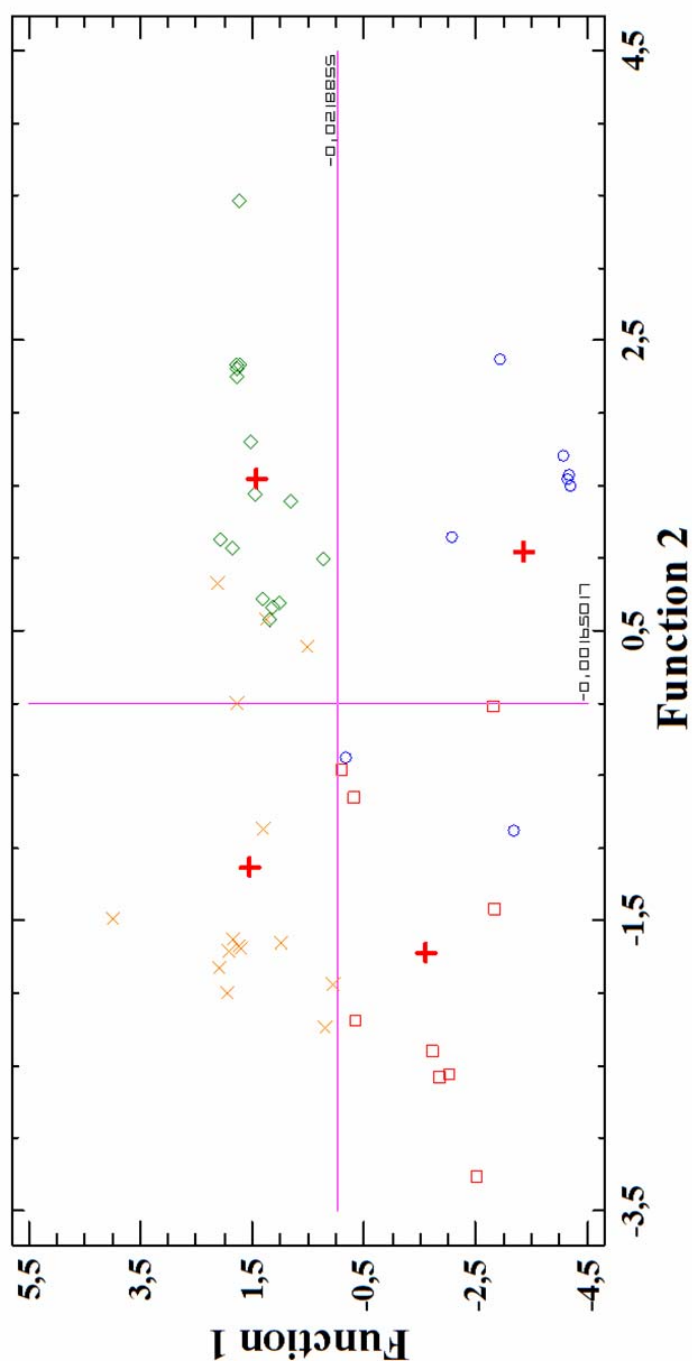


Figure 6. Multiple discriminant analysis (MDA) applied to the immunological data of meconium (blue circles), first week (red squares), third week (orange cross), and 2-years (green rhombus) feces, taking infant's age as the discriminant factor. The red cross represents the mathematical centroid for each age group (meconium, first week, third week, and 2-years fecal samples). The first and second functions, that were plotted as the x and y axes, had a predictive power of 85% and internal axes (pink lines) match the zero values for both functions.

Table 1. Demographic data for the infant cohort.

Infant	Gestational age (week)	Delivery mode	Gender	Birth weight (g)	Sample collection (day of life)[#]
2	30	Cesarean section	Male	1,550	<u>0</u> ; 7; <u>21</u> ; <u>730</u>
4	27	Cesarean section	Female	1,080	<u>0</u> ; 7; <u>21</u> ; <u>730</u>
5	30	Cesarean section	Male	2,030	<u>0</u> ; 7; <u>21</u> ; <u>730</u>
6	30	Vaginal	Male	1,760	<u>0</u> ; 7; <u>21</u> ; <u>730</u>
7	24	Cesarean section	Female	600	<u>0*</u> ; <u>21</u> ; <u>730</u>
9	27	Vaginal	Male	1,540	<u>0</u> ; 7; <u>21</u> ; <u>730</u>
10	26	Cesarean section	Female	790	<u>0</u> ; 7; <u>21</u> ; <u>730</u>
13	32	Vaginal	Female	1,310	<u>0</u> ; 7; <u>21</u> ; <u>730</u>
15	30	Vaginal	Female	1,350	<u>730</u>
18	24	Vaginal	Male	740	7; 21; <u>730</u>
21	28	Cesarean section	Male	1,100	21; <u>730</u>
22	31	Vaginal	Female	1,430	<u>0</u> ; 7; <u>21</u> ; <u>730</u>
28	27	Vaginal	Female	1,040	<u>0</u> ; <u>21</u> ; <u>730</u>
29	29	Cesarean section	Male	680	21; <u>730</u>
30	30	Vaginal	Female	1,370	21; <u>730</u>
31	28	Cesarean section	Female	1,150	21; <u>730</u>

[#] Samples analyzed in this study. Underlined samples correspond to samples analyzed by HITChip: 730 d samples were processed and analyzed in this study, while data from 0 d and 21 d samples were obtained in a previous study. All samples were used for immunological analyses, except one meconium from infant 7 (*) because there was not enough amount of sample for processing.

Table 2. Clinical characteristics of the preterm infants recruited in this study.

Infant	Hospital stay (day)	Antibiotherapy (day)	Mechanical ventilation (day)	Parenteral nutrition (day)	Nasogastric feeding tube (day)
2	42	3	0	5	38
4	60	4	0.5	3	48
5	27	3	2	0	26
6	27	0	0	0	26
7	113	5	9	8	107
9	68	4	2	5	58
10	84	7	0.5	6	70
13	28	3	0	0	21
15	44	3	1	7	38
18	116	27	35	13	112
21	73	7	10	14	62
22	37	3	0	4	35
28	68	7	0	7	62
29	70	15	8	9	60
30	41	4	0	3	40
31	52	3	0	6	47
Mean (95% CI)	58.64 (41.35; 75.93)			4.85 (2.66; 7.05)	52.40 (36.03; 68.82)
Median (IQR)		3.5 (3.0-7.0)	0.25 (0.00-1.75)		

Table 3. Relative counts of genus-like bacterial groups detected in fecal samples collected at 21 days and 2 years after birth from infants that were born preterm using the HITChip microarray^a

Phylum/order	Genus-like phylogenetic group [‡]	21 d	730 d	P-value*	Fold change
		Mean (95% CI)	Mean (95% CI)		
Actinobacteria	<i>Collinsella</i>	0.04 (0.03; 0.04)	0.25 (0.18; 0.32)	0.009	6.77
	<i>Allistipes et rel.</i>	0.09 (0.08; 0.11)	0.38 (0.17; 0.59)	0.009	4.06
	<i>Bacteroides ovatus et rel.</i>	0.06 (0.05; 0.07)	0.38 (0.05; 0.71)	0.009	6.69
	<i>Bacteroides plebeius et rel.</i>	0.04 (0.03; 0.04)	0.12 (0.08; 0.16)	0.009	3.23
	<i>Bacteroides splachnicus et rel.</i>	0.09 (0.08; 0.11)	0.26 (0.11; 0.41)	0.016	2.73
Bacteroidetes	<i>Bacteroides stercoris et rel.</i>	0.04 (0.03; 0.04)	0.11 (0.05; 0.16)	0.009	2.97
	<i>Bacteroides vulgatus et rel.</i>	0.08 (0.05; 0.09)	3.12 (1.54; 4.70)	0.009	39.50
	<i>Parabacteroides distasonis et rel.</i>	0.06 (0.05; 0.07)	0.32 (0.16; 0.48)	0.009	5.20
	<i>Prevotella melaninogenica et rel.</i>	0.11 (0.09; 0.13)	0.88 (-0.16; 1.92)	0.033	8.20
	<i>Prevotella oralis et rel.</i>	0.04 (0.03; 0.04)	0.24 (-0.02; 0.50)	0.016	6.55
	<i>Prevotella tanneriae et rel.</i>	0.02 (0.02; 0.03)	0.10 (0.07; 0.13)	0.009	4.20
	<i>Tannerella et rel.</i>	0.05 (0.04; 0.06)	0.13 (0.11; 0.16)	0.009	2.63
Bacilli	<i>Enterococcus</i>	3.49 (-1.05; 8.03)	0.10 (0.06; 0.13)	0.009	-36.18
	<i>Granulicatella</i>	1.00 (0.19; 1.80)	0.02 (0.01; 0.02)	0.009	-61.31
	<i>Lactococcus</i>	0.02 (0.01; 0.02)	0.73 (-0.02; 1.48)	0.056	41.05
	<i>Staphylococcus</i>	0.19 (-0.05; 0.43)	0.02 (nd)	0.033	-10.86
	<i>Streptococcus intermedius et rel.</i>	0.04 (0.02; 0.05)	0.15 (0.11; 0.20)	0.033	3.96
Clostridium cluster III	<i>Clostridium stercorarium et rel.</i>	0.03 (0.03; 0.04)	0.28 (0.15; 0.41)	0.009	9.26
Clostridium cluster IV	<i>Clostridium cellulosi et rel.</i>	0.13 (0.11; 16)	3.49 (1.20; 5.79)	0.009	26.48
	<i>Clostridium leptum et rel.</i>	0.18 (0.09; 0.28)	2.16 (0.74; 3.57)	0.009	11.81
	<i>Clostridium orbiscindens et rel.</i>	1.03 (-0.68; 2.73)	5.59 (3.90; 7.29)	0.042	5.44
	<i>Faecalibacterium prausnitzii et rel.</i>	0.17 (0.14; 0.20)	5.02 (1.81; 8.22)	0.009	29.35
	<i>Oscillospira guillermontii et rel.</i>	0.15 (0.13; 0.18)	3.10 (-0.13; 6.32)	0.009	20.04
	<i>Papillibacter cinnamivorans et rel.</i>	0.06 (0.05; 0.07)	0.50 (0.34; 0.66)	0.009	8.56
	<i>Ruminococcus bromii et rel.</i>	0.02 (0.02; 0.03)	1.31 (0.20; 2.43)	0.009	52.65
	<i>Ruminococcus callidus et rel.</i>	0.08 (0.07; 0.09)	0.86 (-0.06; 1.78)	0.009	10.57
	<i>Sporobacter termitidis et rel.</i>	0.16 (0.14; 0.19)	1.89 (0.96; 2.81)	0.009	11.56
	<i>Subdoligranulum variable at rel.</i>	0.11 (0.09; 0.13)	2.98 (1.48; 4.48)	0.009	27.51
Clostridium cluster IX	<i>Dialister</i>	0.05 (0.02; 0.07)	0.75 (-0.03; 1.54)	0.009	16.10
Clostridium cluster XI	<i>Anaerovorax odorimutans et rel.</i>	0.05 (0.04; 0.06)	0.41 (0.27; 0.55)	0.009	7.79
Clostridium cluster XIVa	<i>Anaerostipes caccae et rel.</i>	0.09 (0.05; 0.12)	3.94 (2.10; 5.77)	0.009	45.14
	<i>Bryantella formatexigens et rel.</i>	0.14 (0.08; 0.21)	0.69 (0.50; 0.89)	0.009	4.82
	<i>Butyrivibrio crossotus et rel.</i>	0.16 (0.09; 0.23)	1.41 (1.14; 1.68)	0.009	8.89
	<i>Clostridium colinum et rel.</i>	0.05 (0.04; 0.06)	0.14 (0.06; 0.23)	0.009	2.77
	<i>Clostridium sphenoides et rel.</i>	0.12 (0.09; 0.14)	0.85 (0.56; 1.14)	0.009	7.38
	<i>Clostridium symbiosum et rel.</i>	0.22 (0.13; 0.32)	1.81 (1.38; 2.24)	0.009	8.09
	<i>Coprococcus eutactus et rel.</i>	0.08 (0.06; 0.09)	4.96 (2.87; 7.04)	0.009	64.93

Table 3 (cont.). Relative counts of genus-like bacterial groups detected in fecal samples collected at 21 days and 2 years after birth from infants that were born preterm using the HITChip microarray^a

Phylum/order	Genus-like phylogenetic group [¥]	21d Mean (95% CI)	730d Mean (95% CI)	P-value*	Fold change
(cont.)	<i>Dorea formicigenerans et rel.</i>	0.16 (0.08; 0.23)	2.63 (1.86; 3.40)	0.009	16.72
	<i>Eubacterium hallii et rel.</i>	0.04 (0.02; 0.06)	2.23 (1.40; 3.05)	0.009	52.41
	<i>Eubacterium rectale et rel.</i>	0.06 (0.04; 0.08)	0.42 (0.26; 0.58)	0.009	7.09
	<i>Eubacterium ventriosum et rel.</i>	0.05 (0.02; 0.07)	0.28 (0.13; 0.42)	0.009	6.00
	<i>Lachnobacillus bovis et rel.</i>	0.07 (0.05; 0.07)	0.31 (0.26; 0.36)	0.009	4.43
	<i>Lachnospira pectinoschiza et rel.</i>	0.10 (0.07; 0.13)	0.40 (0.28; 0.53)	0.009	4.08
	<i>Roseburia intestinalis et rel.</i>	0.03 (0.01; 0.05)	0.24 (0.15; 0.34)	0.009	7.86
	<i>Ruminococcus lactaris et rel.</i>	0.03 (0.02; 0.03)	0.42 (-0.18; 1.02)	0.009	16.30
	<i>Ruminococcus obeum et rel.</i>	0.26 (0.21; 0.31)	11.42 (8.18; 14.66)	0.009	43.96
Uncultured <i>Clostridiales</i>	Uncultured <i>Clostridiales I</i>	0.17 (0.14; 0.20)	1.11 (0.12; 2.10)	0.009	6.48
	Uncultured <i>Clostridiales II</i>	0.18 (0.16; 0.21)	0.36 (0.21; 0.51)	0.009	1.97
Uncultured <i>Mollicutes</i>	Uncultured <i>Mollicutes</i>	0.08 (0.07; 0.10)	0.32 (-0.07; 0.70)	0.022	3.94
<i>Proteobacteria</i>	<i>Burkholderia</i>	0.01 (nd)	0.10 (-0.04; 0.24)	0.016	10.98
	<i>Enterobacter aerogenes et rel.</i>	14.82 (8.07; 21.57)	0.21 (0.10; 0.32)	0.009	-69.90
	<i>Escherichia coli et rel.</i>	37.06 (24.37; 49.76)	0.82 (-0.25; 1.88)	0.009	-45.41
	<i>Klebsiella pneumoniae et rel.</i>	15.75 (10.18; 21.32)	0.11 (0.05; 0.18)	0.009	-138.34
	<i>Oxalobacter formigenes et rel.</i>	0.02 (0.02; 0.03)	0.17 (0.02; 0.32)	0.009	7.35
	<i>Proteus et rel.</i>	0.29 (0.17; 0.42)	0.09 (0.05; 0.12)	0.009	-3.46
	<i>Serratia</i>	5.18 (1.88; 8.49)	0.15 (-0.04; 0.33)	0.009	-35.00
	<i>Sutterella wadsworthia et rel.</i>	0.08 (0.07; 0.10)	0.23 (0.07; 0.39)	0.009	2.79
	<i>Vibrio</i>	0.11 (0.08; 0.15)	0.04 (0.03; 0.04)	0.009	-2.94
	<i>Yersinia et rel.</i>	1.16 (0.63; 1.68)	0.04 (0.03; 0.04)	0.009	-31.05
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Akkermansia</i>	0.06 (0.00; 0.13)	0.62 (0.34; 0.91)	0.016	9.64

^a Relative counts (log-transformed hybridization signals) are expressed as the mean and 95% confidence interval.

[‡] The genus-like phylogenetic groups shown contributed, at least, 0.1% to the microbial profile of a given sample.

* *t*-tests were used to evaluate differences in the hybridization signal intensities of genus-like bacterial groups across time.

Table 4. Detection and concentrations of cytokines in meconium (0 d) and fecal samples collected at 7, 21, 730 days of life of preterm infants.

	0 d (N = 9)			7 d (N = 9)			21 d (N = 15)			730 d (N = 15)			P-value [#]	P-value [‡]
	n (%)	Median (IQR)	n (%)	Median (IQR)	n (%)	Median (IQR)	n (%)	Median (IQR)	n (%)	Median (IQR)				
Innate immunity														
IL-1β	2 (22.22)	1.24 (0.68-1.80)	7 (77.78)	0.13 (0.05-0.30)	13 (86.67)	0.05 (0.03-0.38)	0	-	0	-	0.000	0.520		
IL-6	1 (11.11)	0.03	2 (22.22)	0.02 (0.02-0.03)	3 (20.00)	0.05 (0.05-0.71)	4 (26.67)	0.3 (0.15-0.47)	4 (26.67)	0.3 (0.15-0.47)	0.094	0.255		
IL-12p70	1 (11.11)	0.06	2 (22.22)	0.11 (0.08-0.15)	4 (26.67)	0.07 (0.05-0.12)	4 (26.67)	0.84 (0.28-1.38)	4 (26.67)	0.84 (0.28-1.38)	0.018	0.601		
IFN-γ*	0	-	0	-	1 (6.67)	3.27	3 (20.00)	9.27 (-7.44; 25.98)	3 (20.00)	9.27 (-7.44; 25.98)	0.000	0.521		
TNF-α	1 (11.11)	0.14	2 (22.22)	0.15 (0.13-0.17)	5 (33.33)	0.18 (0.10-0.25)	3 (20.00)	0.27 (0.17-0.43)	3 (20.00)	0.27 (0.17-0.43)	0.002	0.934		
Acquired immunity														
IL-2	1 (11.11)	0.92	1 (11.11)	0.09	2 (13.33)	0.04 (0.03-0.05)	4 (26.67)	0.04 (0.02-0.15)	4 (26.67)	0.04 (0.02-0.15)	0.003	0.373		
IL-4	4 (44.44)	0.01 (0.00-0.01)	6 (66.67)	0.01 (0.00-0.01)	11 (73.33)	0.01 (0.00-0.01)	15 (100.00)	0.01 (0.00-0.01)	15 (100.00)	0.01 (0.00-0.01)	0.000	0.292		
IL-10	0	-	1 (11.11)	0.03	1 (6.67)	0.04	4 (26.67)	0.03 (0.02-0.23)	4 (26.67)	0.03 (0.02-0.23)	0.000	0.675		
IL-13*	1 (11.11)	0.03	1 (11.11)	0.05	2 (13.33)	0.08 (-0.10; 0.26)	1 (6.67)	0.05	1 (6.67)	0.05	0.568	0.571		
IL-17	4 (44.44)	3.09 (2.32-3.31)	2 (22.22)	0.08 (0.05-0.12)	9 (60.00)	0.07 (0.03-0.19)	12 (80.00)	0.08 (0.04-0.06)	12 (80.00)	0.08 (0.04-0.06)	0.000	0.122		
Chemokines														
IL-8*	4 (44.44)	0.07 (-0.08; 0.21)	1 (11.11)	0.05	3 (20.00)	0.09 (-0.02; 0.20)	0	-	0	-	0.000	0.080		
MCP-1	3 (33.33)	0.03 (0.02-0.03)	1 (11.11)	0.03	4 (26.67)	0.05 (0.03-0.06)	9 (60.00)	0.19 (0.06-0.88)	9 (60.00)	0.19 (0.06-0.88)	0.000	0.639		
MIP-1β	6 (66.67)	0.62 (0.05-1.78)	6 (66.67)	0.05 (0.04-0.16)	8 (53.33)	0.07 (0.02-0.10)	2 (13.33)	0.05 (0.04-0.07)	2 (13.33)	0.05 (0.04-0.07)	0.000	0.537		
GRO-α	3 (33.33)	0.18 (0.16-8.28)	0 (0.00)	-	6 (40.00)	0.16 (0.11-0.19)	3 (20.00)	0.14 (0.13-0.22)	3 (20.00)	0.14 (0.13-0.22)	0.000	0.537		
Hematopoietic factors														
IL-5*	0	-	0	-	1 (6.67)	0.03	5 (33.33)	0.25(0.03; 0.47)	5 (33.33)	0.25(0.03; 0.47)	0.000	0.322		
IL-7	1 (11.11)	0.03	1 (11.11)	0.04	3 (20.00)	0.03 (0.02-0.05)	0	-	0	-	0.000	0.766		
G-CSF	4 (44.44)	1.64 (0.34-4.29)	6 (66.67)	0.06 (0.04-0.17)	12 (80.00)	0.28 (0.15-0.55)	12 (80.00)	0.14 (0.11-0.46)	12 (80.00)	0.14 (0.11-0.46)	0.000	0.220		
GM-CSF	9 (100.00)	0.59 ^a (0.28-55.03)	7 (77.78)	0.23 ^{ab} (0.12-0.40)	15 (100.00)	0.23 ^{ab} (0.18-0.26)	15 (100.00)	0.67 ^{ac} (0.62-0.87)	15 (100.00)	0.67 ^{ac} (0.62-0.87)	0.000	0.002		
IL: interleukin; IFN: interferon; G-CSF: granulocyte-colony-stimulating factor; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; MCP: macrophage/monocyte														

IL: interleukin; IFN: interferon; G-CSF: granulocyte-colony-stimulating factor; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; MCP: macrophage/monocyte chemoattractant protein; MIP: macrophage inflammatory protein; TNF: tumor necrosis factor.

Concentrations (ng/g feces) were expressed as median and interquartile range (IQR).

^an (%): number of samples where the parameter was detected (relative frequency of detection).

[#]Chi-squared tests were used to evaluate differences in expression frequencies of the analyzed parameters.

[‡]One way ANOVA or Kruskal-Wallis tests were used to evaluate differences in concentration across time. Different superscript letters show which medians were different within groups.

*These data sets were normally distributed and concentrations were expressed as mean and 95% CI.

Table 5. Detection and concentrations of immunoglobulins (Ig) in meconium (0 d) and fecal samples collected at 7, 21, 730 days of life of preterm infants.

	0 d (N = 9)			7 d (N = 9)			21 d (N = 15)			730 d (N = 15)		
	n (%) ^a	Median (IQR)	n (%)	n (%)	Median (IQR)	n (%)	n (%)	Median (IQR)	n (%)	Median (IQR)	P-value [#]	P-value [¥]
IgG1	4 (44.44)	0.03 (0.02-0.06)	2 (22.22)	3 (20.00)	0.34 (0.18-0.50)	3 (20.00)	3 (20.00)	0.32 (0.17-0.76)	1 (6.67)	0.06	0.000	0.621
IgG2	6 (66.67)	1.54 (0.84-3.39)	7 (77.78)	3 (20.00)	0.99 (0.84-1.19)	3 (20.00)	3 (20.00)	0.35 (0.27-0.62)	2 (13.33)	0.34 (0.24-0.44)	0.000	0.062
IgG3*	0	-	1 (11.11)	0	0.01	0	0	-	2 (13.33)	0.01 (-0.01; 0.03)	0.000	0.326
IgG4*	2 (22.22)	0.00 (-0.01; 0.01)	3 (33.33)	1 (6.67)	0.01 (-0.00; 0.02)	1 (6.67)	1 (6.67)	0.00	1 (6.67)	0.01	0.000	0.510
IgM	1 (2.08)	0.55	6 (12.50)	11 (22.92)	2.27 (0.53-5.14)	11 (22.92)	11 (22.92)	0.54 (0.33-0.88)	1 (6.67)	0.08	0.000	0.368
IgA	5 (55.56)	1.02 ^a (0.48-67.45)	8 (88.89)	15 (100.00)	26.62 ^{ab} (10.42-58.88)	15 (100.00)	15 (100.00)	6.24 ^{ab} (3.69-26.13)	13 (86.67)	1.13 ^{ac} (0.81-3.18)	0.000	0.004

Concentrations (mg/g feces) were expressed as median and interquartile range (IQR).

^an (%): number of samples where the parameter was detected (relative frequency of detection).

[#] Chi-squared tests were used to evaluate differences in expression frequencies of the analyzed parameters.

[¥] One way ANOVA or Kruskal-Wallis tests were used to evaluate differences in concentration across time. Different superscript letters show which medians were different within groups.

* These data sets were normally distributed and concentrations were expressed as mean and 95% CI.

XIV. 3. LISTADO DE TABLAS

TABLA 1. Tipos de partos prematuros, factores de riesgo asociados e intervenciones que se pueden realizar para su prevención	13
TABLA 2. Actividad biológica de los principales componentes de la leche humana	37
TABLA 3. Composición de la leche de transición y madura de las madres de recién nacidos prematuros en comparación con la leche madura de las madres de los nacidos a término	39
TABLA 4. Impacto de la pasteurización sobre algunos componentes de la leche humana.	46
TABLA 5. Suplementos comerciales para la leche humana administrada a recién nacidos prematuros	48
TABLA 6. Composición (%) y características de las fórmulas de prematuros disponibles en el mercado (por 100 g de producto)	50
TABLA 7. Requerimientos estimados de proteínas y energía para la alimentación enteral, por grupo de peso	50
TABLA 8. Complicaciones asociadas a la nutrición parenteral	51
TABLA 9. Funciones de la microbiota intestinal	68
TABLA 10. Factores que predisponen al desarrollo de sepsis en el neonato	80
TABLA 11. Características de los estudios probióticos llevados a cabo en prematuros	87

XIV. 4. LISTADO DE FIGURAS

FIGURA 1. Posibles resultados del embarazo con relación al parto prematuro y a la muerte fetal.	7
FIGURA 2. Tasas de prematuridad en el mundo en el año 2010	9
FIGURA 3. Evolución de las tasas de prematuridad y bajo peso al nacer en España entre 1980 y 2007	11
FIGURA 4. Tasas de madres mayores de 35 años y su relación con recién nacidos de bajo peso al nacer	15
FIGURA 5. Evolución de la tasa de partos múltiples en España entre 1998 y 2010	16
FIGURA 6. Respuesta fisiológica al estrés en relación al parto pretérmino	17
FIGURA 7. Posibles interacciones entre diversos factores de riesgo del parto prematuro	18
FIGURA 8. Evolución del porcentaje de cesáreas en España desde 1997 hasta 2009	19
FIGURA 9. Porcentaje de complicaciones en los partos vaginales y cesáreas realizados en España en el año 2007	20
FIGURA 10. Principales problemas de salud asociados a la prematuridad	23
FIGURA 11. Anatomía y fisiología del corazón en el periodo fetal y en el neonatal	24
FIGURA 12. Tasas de gonorrea y sífilis en la Comunidad de Madrid (CAM) y en España entre los años 2007 y 2010	29
FIGURA 13. Algoritmo de reanimación neonatal completa en sala de partos	33
FIGURA 14. Relevancia del microbioma, nuestro “otro genoma”	56
FIGURA 15. Diversidad del microbioma humano	57
FIGURA 16. Propuesta de clasificación del microbioma intestinal humano en enterotipos	60
FIGURA 17. Microbiota intestinal humana. Inicio y modulación en diferentes estadios de la vida y situaciones de perturbación	61

FIGURA 18. Fuentes de transmisión vertical de microorganismos entre la madre y su hijo durante el embarazo, parto y periodo postnatal	64
FIGURA 19. La colonización del intestino neonatal está determinada por factores externos e internos	65
FIGURA 20. Ecología microbiana del intestino postnatal en mamíferos	66
FIGURA 21. Señalización entre el hospedador y su microbiota	67
FIGURA 22. Acción integrada de los factores inmunitarios de la lámina propia intestinal	70
FIGURA 23. Eje microbiota-intestino-cerebro	72
FIGURA 24. Posibles rutas de infección intrauterina	74
FIGURA 25. Comparación de la mucosa intestinal de niños nacidos a término y de niños prematuros	75
FIGURA 26. Papel central de las infecciones como causa de morbilidad y mortalidad en los niños prematuros	79
FIGURA 27. Directrices de la FAO/ OMS para la evaluación de probióticos	82

